

Untersuchungen zum Einfrier- und  
Auftauverhalten pharmazeutischer  
Humanproteinlösungen im Großmaßstab

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Fakultät für Chemie und Pharmazie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ralf Zippelius  
aus Straubing

München 2002



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. G Winter betreut

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 12. Juli 2002

.....

(Ralf Zippelius)

Dissertation eingereicht am:	07. August 2002
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Winter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Frieß
Tag der mündlichen Prüfung:	17. September 2002



Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G Winter am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Winter danke ich für die Auswahl des Themas, seine wissenschaftliche Anleitung sowie die anregende Kritik bei der Durchführung der Arbeit.

Der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, danke ich für die Bereitstellung der für die Versuche benötigten Proteinlösungen sowie die finanzielle Unterstützung. Mein Besonderer Dank gilt Hr. Dr. J. Burg, Dr. K. Reichert und Dr. W. Kuhne, auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

Den Kollegen im Institut danke ich für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Anregungen sowie die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung.

Herrn I. Presser danke ich für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit.



**Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet**

## Abkürzungsverzeichnis

$A_{280}$	Lichtabsorption bei 280 nm
c	Konzentration
$C_p$	spezifische Wärme (ggf. auch partielle spezifische Wärme (in J/g/K))
Da	Dalton
$\Delta C_p$	Wärmekapazitätsänderung (in kJ/Mol/K)
$\Delta G$	Änderung der freien Enthalpie (in kJ/Mol)
$\Delta H$	Enthalpieänderung (in kJ/Mol)
$\Delta S$	Entropieänderung (in kJ/Mol)
$\Delta T$	Temperaturdifferenz (in K)
D	denaturierter Zustand
DNA / DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differential Scanning Calourimetric
$E_{280}$	Extinktion bei 280 nm
IFN	Interferon
J	Joule
K	Gleichgewichtskonstante
MAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation
MS	Massenspektroskopie
N	nativer Zustand
$OD_{280}$	optische Dichte bei 280 nm (Absorption)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatographie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE-HPLC	Size Exclusion HPLC
T	Temperatur (absolute Temperatur (in Kelvin))
$T_{trs}$	Halbumwandlungstemperatur
$T_g$	Glasübergangstemperatur
UV	ultraviolett
V	Volumen



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Grundlagen der Proteinstabilität</b>	<b>3</b>
1.1.	Struktur der Proteine	3
1.2.	Chemische Instabilität	4
1.3.	Physikalische Instabilität – Denaturierung	5
1.4.	Thermodynamische Betrachtung der Faltungsreaktion	5
1.4.1.	Grundlagen der Thermodynamik	5
1.4.2.	Charakterisierung des gefalteten Proteins	6
1.4.3.	Thermodynamik der Faltungsreaktion	6
1.4.4.	Einfluss von Lösungsbestandteilen auf die Proteinstabilität	9
1.5.	Proteinstabilität und pH-Wert	10
1.6.	Irreversible Denaturierung	10
1.7.	Proteinstabilisierung durch Hilfsstoffe	11
1.7.1.	Allgemeine Anforderungen an Cryoprotectiva in Parenteralia	11
1.7.2.	Tenside als Stabilisatoren	12
1.7.3.	Nichtreduzierende Disaccharide	12
1.7.4.	Weitere Stabilisatoren - Cosolventien	14
<b>2.</b>	<b>Stressfaktoren während des Einfrier- und Auftauvorgangs</b>	<b>14</b>
2.1.	Der Einfrierprozess	14
2.1.1.	Konzentrationseffekte, eutektischer Punkt und Glasübergang $T_g'$	15
2.1.2.	Einfrieren im Großmaßstab	17
2.1.3.	pH-Shift	17
2.2.	Der Auftauprozess	18
<b>3.</b>	<b>Einfriersysteme für biotechnologische Produkte</b>	<b>20</b>
3.1.	Entwicklung einfrierstabiler Bulklösungen	20
3.2.	Anforderungen an Einfrier- bzw. Temperieranlagen für Biopharmazeutica	21
3.2.1.	Primärpackmittel	21
3.2.2.	Kälteaggregat / Temperieraggregat	22
3.2.3.	Energieübertragung: Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit	22
3.2.4.	Praktische Erwägungen	23
<b>4.</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>23</b>

<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
1.1.	Materialien	25
1.1.1.	Interferon alfa-2a Bulklösung	25
1.1.2.	Peginterferon alfa-2a Bulklösung	26
1.1.3.	Trastuzumab Bulklösung	27
1.1.4.	Daclizumab Bulklösung	28
1.1.5.	Chemikalien und Reagenzien	30
1.2.	Methoden	32
1.2.1.	Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Interferon alfa-2a	32
1.2.2.	Reversed-Phase HPLC von pegyliertem Interferon	32
1.2.3.	Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von pegyliertem Interferon alfa-2a	32
1.2.4.	Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Trastuzumab	33
1.2.5.	Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Daclizumab	33
1.2.6.	Gelelektrophorese von Interferon und Peginterferon Bulklösungen	33
1.2.7.	Gelelektrophorese von Trastuzumab und Daclizumab Bulklösung	34
1.2.8.	Bestimmung der Proteinkonzentration von Interferon Bulklösung	34
1.2.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration von Peginterferon Bulklösung	34
1.2.10.	Bestimmung der Proteinkonzentration (Gesamtproteingehalt) von Trastuzumab Bulklösung	35
1.2.11.	Bestimmung der Proteinkonzentration von Daclizumab Bulklösung	35
1.2.12.	DSC-Messungen	36
1.2.13.	Diafiltration und Diakonzentration von Interferon Bulklösung	36
1.2.14.	Diafiltration und Diakonzentration von Daclizumab Bulklösung	37
1.2.15.	Filtrationen (0.2 µm)	37
1.2.16.	Partikelmessung	37
1.2.17.	Trübungsmessung	38
1.2.18.	pH-Wert Bestimmungen und Einstellungen	39
1.2.19.	pH-Shift Messungen	39
1.2.20.	Leitwertmessung	39
<b>2.</b>	<b>Einfriersysteme</b>	<b>40</b>
2.1.	CryoFin™ -System von Integrated Biosystems	40
2.1.1.	Scale-Down System – CryoPilot™ – A	41
2.1.2.	Theoretische Betrachtungen zum Integrated Biosystem CryoFin™-Concept	42
2.2.	Die KVS-Temperieranlage	44
2.2.1.	Mechanischer Aufbau	44
2.2.2.	Temperatursteuerung der KVS-Temperieranlage	45

<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Qualifizierung der KVS-Temperieranlage</b>	<b>47</b>
1.1.	Einführung	47
1.2.	Zusammenfassung der Operation Qualification (OQ)	48
1.2.1.	Einfrierläufe	50
1.2.2.	Auftauläufe	51
1.2.3.	Erstellung der Auftaurezepte	56
1.3.	PQ des Temperierschranks	58
1.3.1.	Der Einfrierprozess auf $-75^{\circ}\text{C}$	58
1.3.2.	Der Auftauprozess	59
1.4.	Zusammenfassung	60
<b>2.</b>	<b>Bestimmung und Quantifizierung von Cryokonzentrationseffekten</b>	<b>62</b>
2.1.	Cryokonzentrationseffekte in der KVS-Temperieranlage	62
2.1.1.	Probenahme und Versuchsdurchführung	62
2.1.2.	Ergebnisse	64
2.2.	Cryokonzentrationseffekte im 20-Zoll CryoWedge <sup>TM</sup> von Integrated Biosystems <sup>®</sup>	67
2.2.1.	Einleitung und Vorversuche	67
2.2.2.	Versuchsdurchführung und Probennahme	68
2.2.3.	Cryokonzentrationseffekte verschiedener Puffermedien	68
2.2.4.	Einfluss von cryoprotektiven Additiven auf die Cryokonzentrationseffekte	70
2.2.5.	Cryokonzentration von proteinhaltigen Puffermedien	71
2.2.6.	Zusammenfassung	73
2.3.	Diskussion	74
<b>3.</b>	<b>Stabilität von Interferon alfa-2a Bulkwirkstofflösung während Einfrierprozessen in KVS-Temperieranlagen</b>	<b>75</b>
3.1.	Vorversuche bei geringem Beladungsvolumen von 4L	76
3.1.1.	Versuchsdurchführung	76
3.1.2.	Ergebnisse:	76
3.2.	Stabilitätsuntersuchung unter worst case Bedingungen: Interferon-alfa2a Bulk bei 15L Befüllvolumen in KVS-Temperieranlage	77
3.2.1.	Versuchsdurchführung	77
3.2.2.	Ergebnisse	78
3.2.3.	pH-Abhängigkeit der Interferon-Trübung	80
3.2.4.	Einfluss des Befüllvolumens der Edelstahlbehälter auf die Präzipitation	82
3.2.5.	Bestimmung der Cryokonzentration von Interferon Bulklösung	83
3.2.6.	Ermittlung von Grenzflächeneffekten auf die Partikelbildung	84
3.2.7.	Versuch zur Etablierung eines Scale Down Systems	87

3.3.	Untersuchungen am Puffersystem	88
3.3.1.	pH-shift Messung	88
3.3.2.	DSC-Messungen	89
3.3.3.	Schlussfolgerung	97
3.4.	Zusammenfassung und Diskussion	97
<b>4.</b>	<b>Stabilität von pegyliertem Interferon alfa-2a während Einfrier- und Auftauzyklen in KVS-Temperieranlagen</b>	<b>99</b>
4.1.	Einführung und Versuchsdurchführung	99
4.2.	Ergebnisse	101
4.3.	Zusammenfassung und Diskussion	104
<b>5.</b>	<b>Untersuchungen an Trastuzumab Bulklösung</b>	<b>105</b>
5.1.	Stabilität von Trastuzumab Bulklösung während wiederholter Einfrier- Auftauzyklen: Langsames Einfrieren auf –36°C	105
5.1.1.	Einleitung und Versuchsdurchführung	105
5.1.2.	Ergebnisse	106
5.2.	Stabilität von Trastuzumab Bulklösung während wiederholter Einfrier- Auftauzyklen: Schnelles Einfrieren auf –75°C bei verschiedenen Befüllvolumina	107
5.2.1.	Einleitung und Versuchsdurchführung	107
5.2.2.	Ergebnisse	109
5.3.	Zusammenfassung	113
<b>6.</b>	<b>Stabilitätsuntersuchungen im Integrated Biosystems CryoWedge™</b>	<b>114</b>
6.1.	Ergebnisse	114
6.2.	Zusammenfassung	114
<b>7.</b>	<b>Entwicklung einer stabilen Formulierung für das Einfrieren von Daclizumab Bulklösung</b>	<b>116</b>
7.1.	Versuchsplanung und -aufbau	116
7.1.1.	Einfrier- und Auftauversuche	116
7.1.2.	Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung	117
7.1.3.	Auswahl der cryoprotektiven Excipienten	117
7.1.4.	Übersicht und Proben-tabelle	118
7.2.	Ergebnis der Präformulierungsstudie	119
7.2.1.	Aggregationsverhalten – SE-HPLC	119
7.2.2.	Präzipitation von Daclizumab	121
7.2.3.	Stabilisierung von Daclizumab mittels Disaccharid und Polysorbat 80	126
7.3.	Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität des Antikörpers	127
7.4.	Zusammenfassung und Diskussion	131

7.5.	Scale Up	135
7.5.1.	Einleitung und Versuchsdesign	135
7.5.2.	Einfrieren, Lagerung und Auftauen	135
7.5.3.	Versuchsdurchführung und Probenziehung	135
7.5.4.	Ergebnisse	137
7.5.5.	Zusammenfassung und Diskussion	138
7.6.	Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität von Daclizumab	139
7.6.1.	Versuchsdurchführung und Probenahme	139
7.6.2.	Ergebnisse	140
7.6.3.	Diskussion	143
7.7.	Zusammenfassung	144
<b>IV.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>146</b>
<b>V.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>152</b>



## I. Einleitung

Die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse in der Gentechnik und deren Nutzung zur biotechnologischen Produktion von Arzneimitteln eröffneten die Möglichkeit, zuvor nur in sehr geringen Mengen zugängliche proteinogene Wirkstoffe in neuen Größenordnungen herzustellen.

Um eine optimale Auslastung der für diese Art der Herstellung erforderlichen, kapitalintensiven Produktionsanlagen zu ermöglichen, ist es nötig, Produktionsschritte mit unterschiedlicher Kapazität zu verknüpfen. Zu diesem Zweck ist die Schaffung von Lagerkapazitäten verschiedener Zwischenprodukte wünschenswert. Flexibilität in der Nutzung der Produktionsanlagen wird dadurch erreicht, dass Anlagen mit hoher Kapazität, z. B. große Fermenter, für verschiedene Produkte genutzt werden. Zur nachfolgenden Aufreinigung des Produkts werden hingegen mehrere Produktionsansätze benötigt, da nur ein Teil der Biomasse in einem Arbeitsschritt aufgereinigt werden kann. Andererseits kann auch ein Poolen verschiedener Produktionsansätze wünschenswert sein, um beispielsweise den analytischen Aufwand im Qualitätssicherungslabor zu reduzieren. Auch zur marktgerechten Arzneimittelversorgung sind Lagerhaltungskapazitäten bei ausreichender Produktstabilität wünschenswert. Somit kann die Isolierung des hochreinen Bulkwirkstoffes und die Herstellung der endgültigen Arzneimittelrezeptur zeitlich weitgehend unabhängig voneinander erfolgen. Häufig sind diese Produktionsstätten auch räumlich getrennt, bzw. die Produktion des Bulkwirkstoffes wird von einem anderen Hersteller übernommen.

Aufgrund der begrenzten chemischen, physikalischen und biologischen Stabilität biogener Produkte in wässriger Lösung sind verschiedene Möglichkeiten zur Stabilisierung der Intermediate möglich:

Die Trocknung von Proteinlösung ist wegen der Empfindlichkeit der Proteine gegenüber physikalischen Stressfaktoren, wie z. B. Wärme, sehr aufwendig. Methoden, die eine hohe Produktqualität gewährleisten, z. B. Lyophilisation, sind energie- und kostenintensiv und deshalb nicht für große Volumina bzw. mehrmalige Anwendung geeignet.

Die gekühlte Aufbewahrung bei +5°C stellt lediglich eine Möglichkeit zur kurzfristigen Lagerung dar. Chemische Reaktionen sind nur verlangsamt und geringfügige mikrobiologische Kontaminationen können zum vollständigen Produktverlust führen. Der Zusatz von Konservierungsmitteln ist meist unerwünscht, da diese unter Umständen vor

der weiteren Verarbeitung durch sehr aufwendige Reinigungsmethoden wieder entfernt werden müssen.

Aus diesen Gründen werden biogene Produkte meist tiefgefroren. Je nach Produkt und Lösungsbestandteilen sind Lagertemperaturen von bis  $-80^{\circ}\text{C}$  erforderlich, um eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten. Diese sehr tiefen Temperaturen sind notwendig, um möglichst alle Wassermoleküle einzufrieren, da insbesondere solche Wasseranteile, die an der Hydratisierung der Proteine beteiligt sind, noch bis weit unterhalb des  $0^{\circ}\text{C}$ -Punktes in flüssigem Zustand vorliegen [27] und die Denaturierung durch flüssige Wasseranteile begünstigt wird.

Das tiefgefrorene Produkt muss vor der weiteren Verarbeitung wieder aufgetaut werden. Auch dabei ist auf die Vermeidung von Stressfaktoren für die Proteinlösung zu achten.

Aufgrund der Tatsache, dass nicht nur eine Hitze- sondern auch eine Kältedenaturierung von Proteinen möglich ist, wurden wiederholt Qualitäts- und Produktverluste nach dem Einfrieren und Auftauen von biologischen Molekülen berichtet. Hierzu existieren Arbeiten über Aktivitätsverluste von Enzymen [15, 94, 95].

Offensichtlichstes Merkmal hierbei sind Trübungen und Ausfällungen durch Denaturierung sowie Aggregation und Oberflächenadsorption. Es ist festzustellen, dass genaue Untersuchungen hierzu meist fehlen. Der Grund dürfte die Unregelmäßigkeit sein, mit der solche Qualitätsverluste in der Praxis auftreten. Meist wird in diesen Fällen eine tiefgekühlte Lagerung der entsprechenden Produkte vermieden. Die Lagerstabilität der Produkte ist dann jedoch stärker begrenzt und die Gefahr durch mikrobiellen Befall während der Lagerung erhöht.



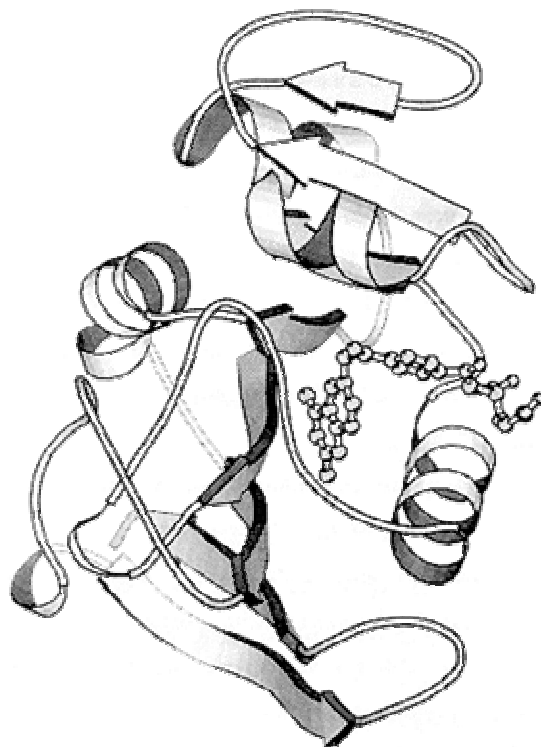
## 1. Grundlagen der Proteinstabilität

### 1.1. Struktur der Proteine

Proteine bestehen aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren. Die Sequenz (Primärstruktur) dieser Aminosäuren determiniert die Funktion des Proteins. Jedoch hat die Ausbildung höherer Organisationszustände essentielle Bedeutung für die Wahrnehmung physiologischer Funktionen. Diese höheren Ordnungszustände werden wiederum in Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur unterteilt.

#### Abbildung I-1

*Bänderdarstellung des Rückgrates eines bakteriellen Enzyms [12]*



Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung benachbarter Aminosäuren. Sie wird durch Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren, die drei bis vier Positionen in der Primärstruktur entfernt stehen, stabilisiert. Es gibt drei charakteristische Ordnungszustände:  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Bereiche geringer Ordnung, sogenannte Schleifen (hair pins oder loop). Letztere verleihen der dreidimensionalen Form der Proteine gewisse Flexibilität, die zur Ausbildung der Tertiärstruktur (Abbildung I-1) notwendig ist. Diese beschreibt die räumliche Ordnung der gesamten Peptidkette. Neben kovalenten Bindungen zwischen zwei intramolekular gelegenen Cystein-Aminosäureresten (Disulfidbrückenbindungen) sind insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten für die Ausbildung der Tertiärstruktur verantwortlich.

Die geringe Bindungsenergie dieser „schwachen Wechselwirkungen“ wird durch die hohe Anzahl kompensiert, so dass Proteine eine beträchtliche Stabilität (20-63 kJ/Mol; [47]) bezüglich ihrer Tertiärstruktur aufweisen – eine essentielle Voraussetzung, da für die biologische Aktivität die korrekte Ausbildung der räumlichen Anordnung, auch Faltung genannt, immer notwendig ist.

Bestehen Proteine nicht nur aus einer Peptidkette, wird die räumliche Stellung der verschiedenen Ketten zueinander als Quartärstruktur bezeichnet.

In ihrer natürlichen Umgebung werden Proteine in der Regel sehr effizient korrekt gefaltet. Verliert ein Protein seine Form, bezeichnet man diesen Zustand als denaturiert oder entfaltet.

## 1.2. Chemische Instabilität

Neben der korrekten Faltung können auch chemische Reaktionen die physiologische Aktivität beeinträchtigen. Aufgrund der chemischen Struktur sind folgende Reaktionstypen besonders häufig zu finden.

- Hydrolyse
- Deamidierung
- Oxidation
- inkorrekte Disulfidbrückenbindung
- Racemisierung
- $\beta$ -Elimination

### 1.3. Physikalische Instabilität – Denaturierung

Unter Denaturierung von Proteinen versteht man den Verlust der charakteristischen Tertiärstruktur aber auch Sekundärstruktur des Proteins. Ursachen können Modifikation der physikalischen oder chemischen Umgebung sein. Die geläufigsten Einflussfaktoren sind Hitze, Zusatz chemischer Denaturantien wie z. B. Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff, Veränderungen des pH-Wertes und hoher Druck [16]. Viele, insbesondere kleine Proteine denaturieren reversibel, d. h. sie erlangen ihre native, gefaltete Form spontan zurück, wenn die äußeren Bedingungen wieder so verändert werden, dass der ursprüngliche Zustand bevorzugt wird.

Größere, globuläre Proteine mit komplexer Tertiärstruktur denaturieren hingegen oft irreversibel. Es bilden sich Aggregate und Präzipitate nachdem erhitzte Lösungen wieder abgekühlt oder das Denaturans entfernt wurde. Auch kleine Proteine zeigen diesen Sachverhalt, wenn hohe Konzentrationen des denaturierten Proteins in Lösungen vorhanden waren.

### 1.4. Thermodynamische Betrachtung der Faltungsreaktion

#### 1.4.1. Grundlagen der Thermodynamik

Die Gibbs-Helmholtzsche Gleichung gibt Auskunft darüber, ob eine chemische Reaktion spontan verläuft:

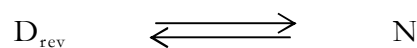
$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

$\Delta G$  = Freie Enthalpie  
 $\Delta H$  = Enthalpie  
 $\Delta S$  = Entropie

$$S = k \ln W$$

$W$  = Anzahl der möglichen Zustände  
 $k$  = Boltzmann-Konstante

Nur wenn die freie Enthalpie einer Reaktion einen negativen Wert annimmt, läuft diese freiwillig ab. Dies gilt auch für die Reaktion einer reversiblen Denaturierung. Der native (N) und der denaturierte ( $D_{rev}$ ) Zustand stehen im Gleichgewicht:



Auch hier gelten die allgemeinen Formeln der Thermodynamik.

#### 1.4.2. *Charakterisierung des gefalteten Proteins*

Das gefaltete Protein ist in einem Zustand relativ hoher Ordnung. Die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren sind im Inneren des Proteins einander zugeordnet und sind in der Lage hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Die hydrophilen Reste der Aminosäuren hingegen sind zum umgebenden Wasser hin orientiert, um so polare Wechselwirkungen, wie z. B., Wasserstoffbrückenbindungen, auszubilden.

Im denaturierten Zustand besitzt das Protein einen hohen Grad an konformationeller Freiheit. Es hat keine feste Struktur, die einzelnen Segmente der Peptidkette sind gegeneinander beweglich und Rotationen um Einfachbindungen sind erlaubt. Jedoch sind in diesem Zustand auch hydrophobe Reste exponiert, und die Kontaktoberfläche zum Wasser hin ist vergrößert.

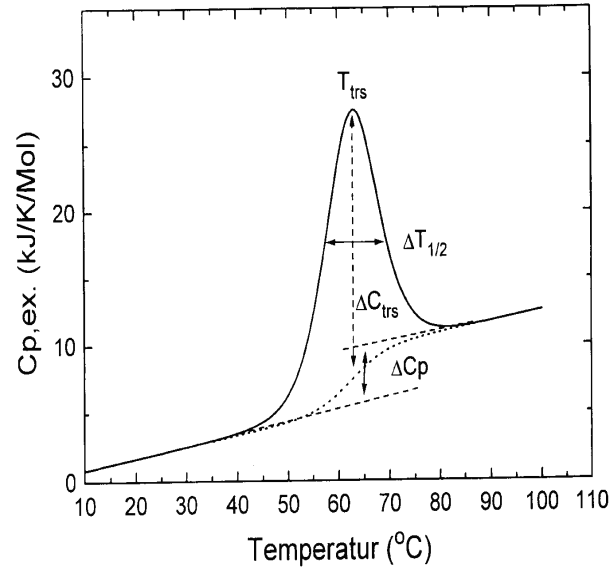
#### 1.4.3. *Thermodynamik der Faltungsreaktion*

Thermodynamisch betrachtet bedeutet der Zustand höherer Ordnung eine reduzierte Entropie, wohingegen die Möglichkeit der Ausbildung von intramolekularen hydrophoben und intermolekularen hydrophilen Wechselwirkungen eine Erniedrigung der Enthalpie bewirkt, zwei Tendenzen, die thermodynamisch gegensätzlich gerichtet sind. Bei der bisherigen Betrachtung des Protein-Wassersystems wurde der Hauptaugenmerk auf das Protein gelegt. Man stellt jedoch bei DSC-Messungen fest, dass die spezifische Wärmekapazität des denaturierten Proteins gegenüber dem nativen signifikant erhöht ist. Abbildung I-2 zeigt idealisiert die DSC-Aufnahme einer Proteindenaturierung. Die Änderung der spezifischen Wärmekapazität wird durch  $\Delta C_p$  wiedergegeben.

Diese charakteristische Änderung der spezifischen Wärmekapazität ist auf die sich am ungefalteten Protein ausbildende Wasserschicht zurückzuführen. Die Wassermoleküle bilden an den hydrophoben Seitenketten eine relativ starre Grenzschicht, ähnlich der an einer Phasengrenze. Bei der Erwärmung des Protein-Wasser-Gemisches muss nun nach der Denaturierung, die durch den Schmelzpeak  $T_{\text{trs.}}$  gekennzeichnet ist, mehr Energie aufgewendet werden. Die Temperatur des Schmelzpeaks wird auch Halbumwandlungstemperatur bezeichnet, da an diesem Punkt das Protein jeweils zur Hälfte nativ bzw. denaturiert vorliegt. Für die Erhöhung der spezifischen Wärmekapazität ist vor allem die „starre“ Struktur des hydrophob gebundenen Wassers, die bei der Erwärmung zum Teil aufgebrochen werden muss, verantwortlich [16].

**Abbildung I-2**

Molare Wärmekapazitätsfunktion eines Proteins mit  $T_{trs}=62^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H=270\text{kJ/Mol}$  und  $\Delta C_p=4,2\text{kJ/K/Mol}$  [20]



Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass die Proteinfaltung unter bestimmten Umständen spontan abläuft, formulierte Anfinsen 1973 [125] folgende These:

„Die dreidimensionale Struktur eines nativen Proteins ist diejenige, bei der das Gesamtsystem Protein-Wasser den niedrigsten Wert der freien Enthalpie annimmt.“

Nach den Gesetzen der Thermodynamik sind Entropie und Enthalpie sowohl von der Temperatur wie auch von der spezifischen Wärmekapazität abhängige Größen:

$$\Delta H_{D-N}(T_2) = \Delta H_{D-N}(T_1) + \Delta C_p \cdot (T_2 - T_1) \quad (1)$$

$$\Delta S_{D-N}(T_2) = \Delta S_{D-N}(T_1) + C_p \cdot \ln T_2 / T_1 \quad (2)$$

Enthalpie und Entropie nehmen mit steigender Temperatur zu, sie gehen jedoch in die Gibbs-Helmholtzsche-Gleichung mit unterschiedlichen Vorzeichen ein. Dadurch ergibt sich für die Funktion  $\Delta G/T$  der freien Enthalpie eine parabolische Form (Abbildung I-3).

Als Schlussfolgerung aus dem Verlauf dieser Funktion ist abzuleiten, dass es nicht nur Hitze- sondern auch Kältedenaturierung geben muss. Der Unterschied ist jedoch, dass bei der Hitzedenaturierung die Zunahme der Entropie des ungefalteten Zustands, bei der Kältedenaturierung die Abnahme der Enthalpie der Entfaltungsreaktion überwiegt.

Es lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

Die freie Enthalpie ( $-\Delta G$ ) ist ein Maß für die Konformationsstabilität eines Proteins.

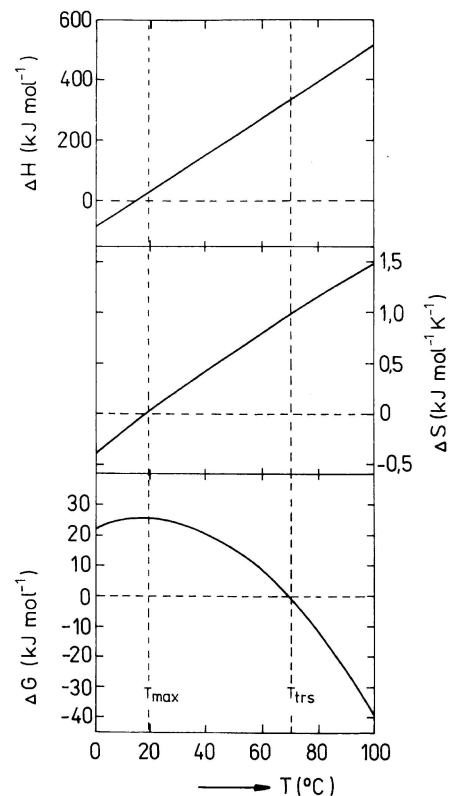
Die Lage von  $T_{\max}$ , also der Temperatur an dem die freie Enthalpie ein Maximum erreicht, ist kein Maß für die Stabilität eines Proteins, sondern gibt nur Auskunft über das Verhältnis von  $\Delta H$  und  $\Delta S$ .

Am Punkt  $T_{\text{trs}}$  ist  $\Delta G=0$ .

### Abbildung I-3

*Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und  $\Delta G$  für die thermische Entfaltung der Struktur des Cytochroms  $b_5$  [20]*

$T_{\text{trs}}$  : Halbumwandlungstemperatur

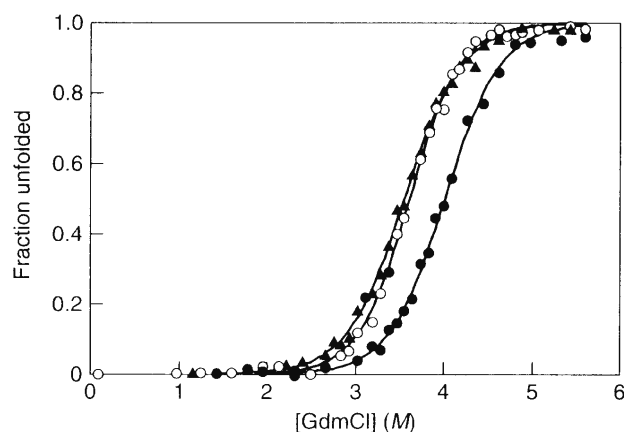


#### 1.4.4. Einfluss von Lösungsbestandteilen auf die Proteinstabilität

Proteine können auch durch Änderung der Zusammensetzung des Lösungsmediums denaturiert werden. Wie bereits angesprochen, darf nicht das Protein isoliert, sondern es

**Abbildung I-4**

*Denaturierung des Wildtyps (●) und zweier destabilisierter Mutanten des (○ ▲) Chymotrypsin-Inhibitor 2 [16]*



muss das Gesamtsystem Protein-Solvens betrachtet werden. Durch Zusatz von Lösungsbestandteilen kann Einfluss auf die Lage des dynamischen Gleichgewichts genommen werden. Klassische Denaturantien wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid können das Peptidgerüst vollständig solubilisieren und somit die hydrophoben Wechselwirkungen verringern [11]. Aufgrund der Tatsache, dass der denaturierte Zustand eine größere Oberfläche zum Solvens besitzt, wird dieser bevorzugt stabilisiert. Innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereichs des Denaturans besteht direkte Proportionalität zum Anteil an ungefaltetem Protein. Abbildung I-4 zeigt Denaturierungskurven von drei verschiedenen Chymotrypsin-Inhibitor-Spezies in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration.

Der Wirkmechanismus von Stabilisatoren ist genau gegensätzlich [8, 48]. Diese Lösungsbestandteile werden bevorzugt vom Kontakt zum Protein hin ausgeschlossen („preferential exclusion“). Durch eine Denaturierung und der damit verbundenen Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Protein und Solvens, würde eine thermodynamisch ungünstigere Situation entstehen. Der Betrag der freien Enthalpie der Entfaltungsreaktion wird also erhöht. Einen genauen Überblick über stabilisierende Hilfsstoffe beim Einfrieren von Proteinlösungen geben Carpenter, Arakawa und Crowe [8]. Die in Proteinformulierungen enthaltenen Lösungsbestandteile wie Puffer und isotonisierende Salze können ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität haben. In der Literatur sind Anhaltspunkte zu finden, die sowohl einen stabilisierenden [1-2], als auch

destabilisierenden Einfluss [33] auf Proteine durch hohe Konzentrationen an Lösungsbestandteilen aufzeigen.

### 1.5. Proteinstabilität und pH-Wert

Die meisten Proteine denaturieren, wenn sie sehr hohen oder niedrigen pH-Werten ausgesetzt sind. Hauptgrund hierfür ist, dass sie saure und basische Gruppen besitzen, die, abhängig davon, ob das Protein in nativen oder denaturiertem Zustand ist, unterschiedliche  $pK_a$ -Werte aufweisen (Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen). So besitzt z. B. eine Glutamatseitenkette im denaturierten Zustand einen  $pK_a$ -Wert von 4.5, im nativen Zustand ist der  $pK_a$  jedoch auf 1.5 erniedrigt, da es eine intramolekulare Brückenbindung mit einer Lysin- oder Arginin-Seitenkette ausbilden kann. Bei einem pH von 7 liegt die Seitenkette sowohl im nativen als auch denaturierten Protein ionisiert vor. Bei einem pH von 4.5, der denaturierte Zustand ist zu 50% protoniert, verschiebt diese Protonierung das Gleichgewicht um den Faktor 2 in Richtung des denaturierten Proteins. Bei einem pH-Wert von 3.5 ist das Gleichgewicht bereits um den Faktor 10 verschoben, da der pH eine Einheit unterhalb des  $pK_a$ -Wert liegt. Dieser einfache thermodynamische Sachverhalt ist in der Realität etwas komplexer, da Proteine eine Vielzahl von ionisierbaren Gruppen mit überlappenden  $pK_a$ -Werten besitzen.

Darüber hinaus werden Proteine durch sehr hohe bzw. niedrige pH-Werte stark positiv bzw. negativ geladen. Die daraus resultierende elektrostatische Abstoßung bewirkt eine Destabilisierung, da die hydrophoben Wechselwirkungen, die den nativen Zustand des Proteins stabilisieren dann von der elektrostatischen Abstoßung überlagert werden.

Auf der anderen Seite ist am isoelektrischen Punkt (IEP) die Löslichkeit des Proteins am geringsten, da es nach Außen hin ungeladen ist. Dies führt zu einer erhöhten Gefahr der Präzipitation des Proteins.

### 1.6. Irreversible Denaturierung

Während bei der Hitzedenaturierung eine irreversible Denaturierung infolge starker Verdrillung an den „loops“ durch ausgeprägte thermische Schwingung leicht vorstellbar ist, kann dies bei der Kältedenaturierung nur mit Folgereaktionen des ungefalteten Proteins begründet werden. Besonders große Proteine mit komplexer Struktur zeigen häufig irreversible Schäden nicht nur durch Hitze- sondern auch nach Kälteeinwirkung.



Die Zusammenhänge, die zu diesem Phänomen führen, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Bei Untersuchungen der Faltungsreaktion von mehreren Proteinen konnte für die Renaturierungsreaktion durch langsames Entfernen des Denaturans gezeigt werden, dass zwei Prozesse in Konkurrenz stehen. Zum einen die Faltungsreaktion und zum anderen intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen, die zur Bildung von löslichen Aggregaten und Praecipitaten führt [5, 10, 30]. Ist nun die Geschwindigkeit der Faltungsreaktion im Einzelfall langsam genug, dass die denaturierten Proteine in hydrophobe Wechselwirkung treten können, findet während der Verdünnung Aggregation und Praecipitation statt.[96]. Das Ausmaß der Praecipitierung nimmt mit der Proteinkonzentrationen zu [5].

Im Falle der Kältedenaturierung ist ein analoger Prozess vorstellbar. Infolge der tiefen Temperaturen kommt es zur reversiblen Denaturierung und anschließenden Aggregation der Proteine. Renaturierungsreaktion und irreversible Denaturierung stehen nun in Konkurrenz. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Renaturierungsreaktion langsam genug, kann es zu einer irreversiblen Schädigung des Proteins kommen.

## 1.7. Proteinstabilisierung durch Hilfsstoffe

### 1.7.1. *Allgemeine Anforderungen an Cryoprotectiva in Parenteralia*

Die in parenteralen Arzneimittel eingesetzten Hilfsstoffe zur Stabilisierung von Proteinen müssen bestimmte Forderungen erfüllen. Ihre Hauptaufgabe ist natürlich die Stabilisierung des Proteins, sowohl während verschiedener Herstellschritte (z. B. Einfrieren und Auftauen, Abfüllung, Lyophilisation) als auch während der Lagerung. Darüber hinaus müssen sie die Anforderungen an Löslichkeit in wässrigen Medien, geringer Toxizität und chemischer Inertheit erfüllen. Nach der Applikation sollte eine rasche Elimination erfolgen, biologische oder pharmakologische Wirkungen waren unerwünscht.

Häufig wird eine ausreichende stabilisierende Wirkung nicht durch den Zusatz eines einzigen Hilfsstoffes erreicht. Viele auf dem Markt befindliche Arzneimittel enthalten eine Kombination verschiedener Stoffe, auch wenn eine thermodynamische Charakterisierung dieser komplexen Stoffgemische sehr schwierig ist. Ich möchte mich an dieser Stelle auf die Diskussion der in dieser Arbeit verwendeten Hilfsstoffklassen beschränken.

### 1.7.2. *Tenside als Stabilisatoren*

Obwohl Tenside meist als Kosolventien angesehen werden, können Eigenschaften nachgewiesen werden, die andere Kosolventien nicht besitzen. So rufen z. B. ionische Detergentien, wie z. B. SDS (Natriumdodecylsulfat), bereits in sehr geringer Konzentration ( $< 0.1\%$  V/m) eine Denaturierung von Proteinen hervor. Im Gegensatz hierzu zeigen nichtionische Tenside selbst bei höherer Konzentration ( $1\%$  V/m) meist keine Denaturierung [84]. Pharmazeutischen Einsatz finden meist nichtionische Tenside, die sich von Polysorbaten oder Polyethern ableiten.

Ursprünglich wurden Tenside zu Proteinformulierungen zugesetzt, um Grenzflächenphänomene zu reduzieren, da diese häufig zur Denaturierung und Adsorption des Proteins und somit zu Bildung inaktivierter Aggregate führen. So wurde die Aggregation von denaturiertem Insulin an hydrophoben Oberflächen eingehend untersucht. Monomeres Insulin adsorbiert an hydrophoben Oberflächen oder Grenzflächen und denaturiert. Das native monomere Insulin besitzt exponierte hydrophobe Regionen, die zu der Oberflächenadsorption und nachfolgend zur Bildung von Aggregaten führen [58-62]. Tenside können sich an hydrophoben Grenzflächen wie Gas-Flüssig oder Fest-Flüssig anlagern. Darüber hinaus reduzieren sie die Oberflächenspannung und verringern dadurch die freie Energie des Systems, wodurch Interaktionen zwischen Proteinen und Proteinen mit Oberflächen reduziert werden. Neueste Studien zeigen, dass grenzflächenaktive Stoffe an hydrophoben Oberflächen [59-63], Gas-Flüssig-Grenzflächen [64 - 68] sowie an hydrophoben Bereichen des Proteins binden und somit eine Stabilisierung des Proteins bewirken können. Indem die Tenside an die hydrophoben Seitenketten der Proteine binden, reduzieren sie die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, wodurch eine Reduktion der Aggregation erreicht werden kann [69-71]. Dieser duale Wirkmechanismus erklärt, die Eigenschaft der Tenside, Proteine sowohl vor oberflächeninduzierten Denaturierung als auch vor Protein-Protein-Interaktion zu schützen.

### 1.7.3. *Nichtreduzierende Disaccharide*

Während der letzten Jahre gab es zahlreiche Veröffentlichungen, die über eine Stabilisierung von Proteinen mittels Zuckern während Einfrier-, Lyophilisations- und Trocknungsprozessen berichteten [72-75]. Neuere Studien zeigten darüber hinaus die Eigenschaft dieser Zucker, auch Antikörper während Gefriertrocknung [76 - 78] oder Sprühtrocknung [79 - 82] zu stabilisieren. Eingehende Untersuchungen zur Stabilisierung von Phosphofruktokinase mittels verschiedener Zucker während Gefrier- und Trocknungsprozesses zeigten die Überlegenheit von Disacchariden, insbesondere von

Trehalose und Saccharose gegenüber Monosacchariden und Aminosäuren [8]. Reduzierende Disaccharide können zwar grundsätzlich eine Denaturierung des Proteins verhindern, führen jedoch aufgrund der Maillard-Reaktion zwischen Carbonyl-Kohlenstoff des Zuckers und Aminogruppen der Proteine zu einer Degradation der Proteine. Neben möglicher Inaktivierung kann dies zu einer Braunfärbung des Produkts führen [83].

Als Grund für die stabilisierende Wirkung dieser Kohlenhydrate werden drei Modelle diskutiert: Die „watersubstitute“, „glassy state“ und die „preferential exclusion“ Hypothesen. Hierbei handelt es sich nicht um konkurrierende, sondern um sich ergänzende Erklärungsversuche. Die ersten beiden Modelle versuchen die stabilisierende Wirkung der Zucker während Trocknungsprozessen zu veranschaulichen.

Die „glassy state“ Hypothese postuliert die Ausbildung von glasartigen Zuständen, also der Immobilisierung des Proteins unter Ausbildung eines Glases, wodurch die Reaktionskinetik stark herabgesetzt wird [86]. Disaccharide erhöhen die Glasübergangstemperaturen  $T_g$  bzw.  $T_g'$ . Hierdurch wird die Reaktionskinetik bei gleicher Temperatur erniedrigt.

Das „water substitute“ (oder auch „water replacement“) Modell erklärt die stabilisierende Wirkung durch freie Hydroxylgruppen des Zuckers, die dem Protein während und nach Entzug des Wassers zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stehen. Dies erniedrigt die freie Enthalpie des Systems, wodurch eine Stabilisierung des nativen Proteins bewirkt wird.

Pikal [38] beschreibt die „water substitution“ Hypothese als thermomechanischen Mechanismus, der von der freien Energie der Faltungsreaktion abhängig ist, während die Verglasung rein kinetischen Ursprungs ist. Die Grundvoraussetzung für beide Modelle ist die Ausbildung von hydrophilen Wechselwirkungen, die im getrockneten Produkt mittels FTIR-Spektroskopie nachweisbar sind [84, 85].

Die „preferential exclusion“ erklärt die Stabilisierung von Proteinen im wässrigen Medium unter dem Einfluss eines Kosolvens. Dieses Kosolvens wird im wässrigen System tendenziell vom Kontakt zum Protein ausgeschlossen, wodurch die Oberflächenspannung des Wassers erhöht wird. Das Protein wird vollständig von einer kosolvensfreien Hydrathülle umgeben. Dies führt zu einer Erhöhung der freien Energie des Systems infolge einer Erniedrigung der Entropie. Eine Denaturierung des Proteins würde zu einer Vergrößerung der Grenzfläche zwischen Protein und Wasser mit der Exponierung hydrophober Anteile führen. Die Folge wäre eine noch stärkere Erniedrigung der Entropie und somit eine noch stärkere Erhöhung der freien Energie des Systems.

#### 1.7.4. *Weitere Stabilisatoren - Cosolventien*

Die thermodynamischen Zustände in wässrigem Medium unter dem Einfluss von anderen Kosolventien wurden für eine Reihe von Proteinen untersucht [87-89]. Der „preferential exclusion“-Effekt, also der Ausschluss des Kosolvens aus der Grenzschicht zum Protein, kann in Folge rein sterischer Ausgrenzung (z. B. Polyethylenglykole), durch Erhöhung der Oberflächenspannung (Zucker und Aminosäuren) oder durch chemische Inkompatibilitäten mit der Proteinoberfläche (z. B. elektrostatische Abstoßung, 2-Methyl-2,4-Pentandiol, MPD [87]) erzielt werden.

## 2. Stressfaktoren während des Einfrier- und Auftauvorgangs

Die Stressfaktoren für Proteine während des Einfrierprozesses kann in zwei Untergruppen gegliedert werden:

- a) Das Phänomen der Kältedenaturierung und
- b) physikochemische Veränderungen der Proteinlösung infolge des Einfrierprozesses.

Die Tendenz der Proteine zur Kältedenaturierung stellt dann nur ein Problem dar, wenn das Protein aufgrund der Thermodynamik der Faltungsreaktion bereits bei Temperaturen knapp unterhalb des Gefrierpunkts eine ausgeprägte Tendenz zur Denaturierung aufweist. Dieses Phänomen zeigen allerdings nur ein geringer Teil der Proteine, insbesondere Enzyme und andere globuläre Proteine, die in mehrere Untereinheiten dissoziieren können [93]. Allerdings treten Produktverluste auch infolge physikochemischer Veränderungen des Puffermediums auf. Dies ist kein rein temperaturabhängiges Phänomen, sondern eine Folgereaktion von Entmischungs- und Ausfällungsprozessen. Darüber hinaus können auch mechanische Kräfte infolge der Eiskristallisation schädlichen Einfluss auf das Protein haben. Aus diesem Grund sollen die molekularen Vorgänge während der Einfrier- und Auftauprozesse genauer erläutert werden. Diese Phänomene können jedoch nicht getrennt von einander betrachtet werden. Sie können sich gegenseitig beeinflussen und verstärken. Es ist auch denkbar, dass erst durch physikochemische Veränderungen des Puffermediums Voraussetzungen für das verstärkte Auftreten von Kältedenaturierung geschaffen werden.

### 2.1. Der Einfrierprozess

In reinem Wasser setzt die Eisbildung bei Temperaturen  $< 0^{\circ}\text{C}$  ein. Jedoch ist es unter geeigneten Versuchsbedingung (Abwesenheit von Kristallisationskeimen und hinreichend kleines Probenvolumen) möglich, eine Unterkühlung auf bis zu  $-40^{\circ}\text{C}$  zu erreichen. Die

Ursache hierfür ist die erschwerte Bildung von Kristallisationskeimen. Diese bilden sich in reinem Wasser an ausreichend großen, hexagonalen, sehr kurzlebigen Clustern. Mit abnehmender Temperatur nimmt die Lebensdauer dieser Cluster und somit die Nukleationsneigung zu (homogene Keimbildung [20, 34]). Die Anwesenheit von dispergierten Teilchen führt zur energetisch günstigeren heterogenen Keimbildung. Eis bildet in Abhängigkeit von Druck und Temperatur acht verschiedene Kristallformen aus. Zwischen  $-150^{\circ}\text{C}$  und  $0^{\circ}\text{C}$  bildet es eine stabile hexagonale Kristallmodifikation mit relativ großen Hohlräumen. Die anderen Strukturen entstehen z. B. durch rasches Abkühlen und wandeln sich im diesem Temperaturbereich in die stabile hexagonale Struktur um [20].

Das Einfrierverhalten einer wässrigen Lösung mit darin solvatisierten Lösungsbestandteilen unterscheidet sich davon jedoch signifikant. Je nach Natur und Zusammensetzung der Lösungsbestandteile können verschieden Phänomene beobachtet werden.

#### *2.1.1. Konzentrationseffekte, eutektischer Punkt und Glasübergang $T_g$*

Während beim Einfrieren kleiner Volumina zuerst eine Unterkühlung der Lösung auftritt, die zu einem Erstarren mit erst nachfolgender Kristallbildung führt und man deshalb nur mit geringen Konzentrationseffekten von Lösungsbestandteilen rechnen muss, stößt man bei größeren Mengen auf physikalische Grenzen. Ein protrahiertes Kristallwachstum in der Produktlösung kann meist nicht verhindert werden.

Mit zunehmender Gebindegröße besteht also die Gefahr der Ausbildung konzentrierter Lösungsanteile während des Einfrierprozesses: Ionen beispielsweise bilden im Kristallgitter des Eises Fehlstellen und stören die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen [97, 98]. Daher werden diese während des Eiskristallwachstums vorzugsweise aus dem Kristallgitter ausgeschlossen und aufkonzentriert. Nur ein kleiner Teil der Ionen wird im Eiskristallgitter eingeschlossen. Somit kommt es zwischen den Eiskristallen zur Bildung von hochkonzentrierten Lösungsbereichen. Infolge der Unterschreitung des Löslichkeitsproduktes der Salze kann es zur Auskristallisierung oder auch zum amorphen Erstarren der hochkonzentrierten Lösung kommen.

Häufig enthalten pharmazeutische Lösungen Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, die bekanntermaßen bei  $-21,3^{\circ}\text{C}$  ein Eutektikum bilden. Auch hier entsteht zuerst eine konzentrierte Salzlösung, aus der sich bei weiterer Abkühlung Salzkristalle abscheiden.

Unterhalb der Temperatur des eutektischen Punktes trennt sich das System in Eis und Salzkristalle und bildet so ein Kristall-Gemisch. Der eutektische Punkt gibt also das Mischungsverhältnis der Komponenten an, bei dem die tiefste Temperatur für das thermodynamische Gleichgewicht zwischen fest und flüssig erreicht wird.

In Vielstoffsystemen werden, abhängig von Substanzeigenschaften und Abkühlgeschwindigkeit unreine Kristalle, Mischkristalle bis zu amorphen Mischungen gebildet. Auch hier können wieder während des Einfrierprozesses unterkühlte Zustände erreicht werden, d. h. die Auskristallisation der Lösungsbestandteile wird erst unterhalb der eutektischen Temperatur beobachtet.

Auch Proteine können einen Einfluss auf den Einfriervorgang haben, da diese mit der Eisoberfläche interagieren können. Diese Wechselwirkungen wurden auf dem Gebiet der gefrierpunktserniedrigenden Glykoproteine von DeVries [14] und Avonov [4] genau untersucht. Hew und Yang [21] zeigten, dass Proteine sowohl das Kristallwachstum verstärken, als auch unterdrücken können. Durch die ungleichmäßige Adsorption von gefrierpunktserniedrigenden Glykoproteinen an bestimmte Eisstrukturen wird das Kristallwachstum verhindert, wodurch es zu einem starken Unterkühlen der Lösung kommen kann.

Das Protein selbst und in einer Lösung möglicherweise enthaltene Kohlenhydratbestandteile kristallisieren jedoch nicht aus. Diese bleiben amorph und erstarren am Ende des Einfrierprozesses in einem glasartigen Zustand, der große Teile an nicht auskristallisiertem Wasser („non frozen water“) enthält [38].

Um also das Protein in einen wirklich „festen“ Zustand zu überführen, muss die Glasübergangstemperatur  $T_g'$  des amorphen Systems unterschritten werden. Im Temperaturbereich knapp oberhalb der Glasübergangstemperatur, jedoch unterhalb des eutektischen Punktes der enthaltenen Bestandteile liegt das Produkt in einem gummiartigen, also zähflüssigen Zustand vor [19]. In diesem Bereich findet eine allmähliche Umwandlung einer instabilen, amorphen Flüssigkeit in einen metastabilen amorphen Festzustand über. Allerdings spielt die Glasübergangstemperatur beim reinen Einfrierprozess eine geringere Rolle als während der Lyophilisation, da ein Trocknungsprozess – also der Entzug des Bulkwassers - ausbleibt. Trotzdem besteht auch hier die Gefahr, dass Proteine durch ungünstige Milieubedingungen wie pH-Werte oder hohe Salzkonzentrationen Schaden nehmen. Durch eine sehr starke Aufkonzentrierung des Proteins ist mit einer Präzipitation des Proteins zu rechnen. Prozesse, die zu einer erheblichen Konzentrierung der Lösungsbestandteile führen, sollten daher vermieden

werden. Allerdings gibt es auch mehrere Studien die belegen, dass das Ausmaß der Aggregation bei erhöhter Ausgangskonzentration verringert ist [85, 99-101].

### 2.1.2. *Einfrieren im Großmaßstab*

Während bei einem Einfrierprozess in kleinen Gebinden, z. B. zu Beginn einer Lyophilisation eine Unterkühlung und anschließend sehr schnelle Erstarrung des Produktes abläuft, kann beim Einfrieren im Großmaßstab nicht mit einem schnellen Durchfrieren der Lösung gerechnet werden. Statt dessen besteht die Gefahr, dass sich eine stark unterkühlte Lösung bildet, in der sich aufgrund erster Eiskbildungsschichten ein für das Protein ungünstiges Milieu bildet. Das Protein-Elektrolyt-Gemisch wird nur zum Teil im interdendritischen Spalt, also zwischen den wachsenden Eiskristallen, eingeschlossen und im glasartigen Zustand eingefroren. Daher kommt es Inneren des Behälters zu einer Aufkonzentrierung der Lösungsbestandteile. Hohe Protein sowie Salzkonzentrationen, sowie pH-Wert-Veränderungen können zu Präzipitation und damit einer irreversiblen Schädigung des Produkts führen.

### 2.1.3. *pH-Shift*

Der pH-Wert der meisten Proteinformulierungen bewegt sich in einem Bereich von pH 5 bis 7, da hier die Gefahr von Deamidierung und Isomerisierung am geringsten ist. Allerdings liegt der isoelektrische Punkt der meisten therapeutischen Proteine im gleichen Intervall. Somit sind Veränderungen des pH-Wertes auf der einen Seite mit chemischen Abbaureaktionen und Denaturierung, auf der anderen Seite mit der Gefahr von Präzipitatbildung verbunden [92]. Der pH-Wert der Lösung sollte mindestens 0.5 Einheiten vom isoelektrischen Punkt entfernt sein, um eine Präzipitatbildung infolge geringer Löslichkeit des Proteins zu vermeiden.

Einige Puffersysteme zeigen ausgeprägte pH-Wert-Verschiebungen während des Einfrierprozesses. Dies ist bei mehrprotonigen Puffersystemen mit unterschiedlicher Löslichkeit der einzelnen Pufferkomponenten zu beobachten. In Natriumphosphatpuffer ist eine deutlich pH-Wert Absenkung während des Einfrierprozesses nachweisbar, da Dinatriumhydrogenphosphat bei tiefer Temperatur eine geringere Löslichkeit besitzt als Natriumdihydrogenphosphat [115].

Die pH-Wert Zeit-Kurve zeigt darüber hinaus eine deutliche Hysterese zwischen Einfrier- und Auftaukurve. Der für das Protein ungünstige pH-Wert liegt somit nicht nur während des Einfriervorgangs, sondern auch für noch längere Zeit während des Auftauvorgangs vor. Der Wahl des geeigneten Puffermediums sowie des pH-Wertes muss somit großes

Interesse geschenkt und die Stabilität des Proteins bei verschiedenen Temperaturen überprüft werden.

## 2.2. Der Auftauprozess

Für die weitere Verarbeitung (z. B. der Endformulierung und Abfüllung) muss gefrorenes Material wieder aufgetaut werden. Sowohl für das Erwärmen der gefrorenen und flüssigen Masse, als auch für die Zerstörung des Eiskristallgitters, also nur für die Durchschreitung des Schmelzpunktes werden erhebliche Mengen an Energie benötigt.

Zu Beginn des Auftauprozesses entsteht ein Temperaturgradient durch die Eisschichten. Die Energie wird vom Behältermantel an das Produkt und im Produkt allein durch Wärmeleitung übertragen. Nach Erreichen des Schmelzpunktes bilden sich flüssige Anteile an der Grenzfläche, von der Energie zugeführt wird. Durch zu hohen Energieeintrag auf die Behälteroberfläche besteht dann die Gefahr einer lokalen Wärmeschädigung.

Die pro Zeiteinheit übertragbare Energiemenge ist von folgenden Parametern abhängig:

- Temperaturunterschied zwischen Überträgermedium und Produktbehälter
- Wärmeübergang zwischen Überträgermedium und Behälter
  - Konvektionsbewegungen des Überträgermediums
  - Oberfläche des Behälters
  - Wärmeübergangskoeffizient (Materialkonstante)
  - Wärmeleitung durch den Behältermantel
  - Spezifische Wärmeleitfähigkeit (Materialkonstante)
  - Dicke der Behälterwandung
- Wärmeübergang zwischen Behälterwand und Produkt
  - Konvektionsbewegungen und Wärmeleitfähigkeit der Produktlösung
  - Innenoberfläche des Behälters
  - Wärmeübergangskoeffizient (Materialkonstante)

Durch Veränderung der außen angelegten Temperatur und Wahl eines geeigneten Überträgermediums kann man leicht Einfluss auf den Wärmeübergang zum Behältermantel nehmen. Gängige Materialien sind Kunststoffflaschen (Teflon, Polypropylen) und für größere Gebinde Edelstahl. Stoffe mit hohem Wärmeleitwert ermöglichen einen schnelleren Energietransport, bergen jedoch auch die Gefahr einer Produktschädigung



durch Überhitzung. Glas ist als Primärpackmittel nicht geeignet, da es während des Einfrierens bersten würde.

Da die Wärmeleitung einer wässrigen Lösung, die sich aus der spezifischen Wärmeleitfähigkeit ohne Konvektionsbewegung und Wärmeleitung durch natürliche Konvektion und Diffusion zusammensetzt, sehr gering ist, kann versucht werden diese durch Rührbewegungen zu verbessern. Starke hydrodynamische Scherkräfte können jedoch zu Schaumbildung und Produktverlust führen und sind daher zu begrenzen [41].

Eine Vergrößerung der Oberfläche ist durch eine Erhöhung der Anzahl oder durch aufwendige Einbauten bzw. besonders geformte Behälter möglich. Während die erste Möglichkeit den Nachteil einer aufwendigeren Abfüllung und Entleerung unter Sterilbedingungen mit sich zieht, sind im zweiten Fall die Anschaffungskosten für Spezialbehälter sehr hoch. Darüber hinaus sind einfache Behälter mit glatten Oberflächen sehr viel einfacher und sicherer zu reinigen. Die Behälterwandtemperatur darf einen für das jeweilige Produkt definierten Grenzwert nicht überschreiten. Hilfreich hierbei ist eine ständige Durchmischung der flüssigen Phase während des Auftauprozesses. Die Energie wird durch aktive Konvektionsbewegungen homogen auf die wässrige Phase und somit auch auf das noch verbleibende Eis verteilt. Der Auftauprozess ist also nicht nur auf die durch natürliche Konvektion und Wärmeleitung zugeführte Wärme angewiesen. Außerdem findet eine permanente Produktdurchmischung statt. Bereiche, die durch Konzentrationseffekte beim Einfrieren bereits bei tieferen Temperaturen als die Restlösung auftauen, werden schnell durch weitere Produktanteile verdünnt.

Während des Auftauprozesses werden jedoch wiederum Glasübergangstemperatur, eutektischer Punkt und Schmelzpunkt durchlaufen. Es ist also mit dem nochmaligen Auftreten aller zuvor angesprochenen Stressfaktoren zu rechnen.

Soll eine Teilentnahme von Produktlösung aus einem großen Gebinde erfolgen, so ist auch hier darauf zu achten, dass immer die gesamte Produktlösung vollständig aufgetaut und durchmischt, also homogen ist. Ansonsten besteht infolge der Cryokonzentrationsprozesse während des Einfrierprozesses die Gefahr einer inhomogenen Produktentnahme. Schlimmsten Falls hätte dies zur Folge, dass die genaue Zusammensetzung der Wirkstofflösung hinsichtlich Wirkstoff- und Hilfsstoffkonzentrationen nicht mehr bekannt ist. Darüber hinaus könnte die Chargenhomogenität in Frage gestellt werden.

### **3. Einfriersysteme für biotechnologische Produkte**

#### **3.1. Entwicklung einfrierstabiler Bulklösungen**

Während der Entwicklung des Produktionsverfahrens wird der Notwendigkeit, die Wirkstofflösung in verschiedenen Zwischenschritten einfrieren zu können, oft nur geringe Aufmerksamkeit geschenkt. Die Formulierungen der Wirkstofflösungen wurde daher oft nicht für Einfrierprozesse entwickelt oder optimiert. Zeigen die Wirkstofflösungen während des Entwicklungsprozesses im Kleinmaßstab bereits deutliche Instabilitäten während des Einfrierens, wird eine tiefgekühlte Lagerung zunächst vermieden. Häufig treten erst durch das im Produktionsprozesses notwendige Upscaling entsprechende Instabilitäten auf. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zulassungsdossiers oft schon bei der Behörde in Bearbeitung, so dass eine Veränderung der Zusammensetzung der Wirkstofflösungen nicht mehr möglich ist. Dies macht deutlich, dass bereits während der frühen Entwicklungsphase nach geeigneten Bulkwirkstoffformulierungen gesucht werden sollte.

Allgemeine Praxis in der Pharmazeutischen Industrie ist es, die Produktlösungen in Kunststoff-Flaschen mit geringem Volumen – meist weniger als 2 L – abzufüllen und anschließend in Kühlräumen od. Gefriertruhen einzufrieren. Der Auftauprozess findet, je nach Wärmeempfindlichkeit des Produkts, in Kühlräumen bei +5°C, bei Raumtemperatur oder in thermostatisierten Wasserbädern statt. Der Validierungsaufwand für diese Art der Cryokonservierung ist relativ gering. Es werden bestimmte Zielparameter hinsichtlich nicht zu überschreitender Temperaturgrenzen für das Produkt festgelegt, sowie ein Zeitraum erfasst, der ausreicht um die gesamte Produktlösung einzufrieren bzw. aufzutauen. Entspricht die Qualität der Wirkstofflösung nach dem Auftauen noch den Vorgaben, gilt der Prozess als validiert und kann angewandt werden. Den physikalischen und chemischen Prozessen innerhalb der Produktlösung während des Einfrier- und Auftauvorgangs wird nur geringe Bedeutung zugemessen. Jedoch können diverse Parameter während des Einfriervorgangs eine Auswirkung auf diese physikochemischen Prozesse und somit auf das Produkt besitzen: Das Einfrierverhalten und die Einfriergeschwindigkeit in diesen Behältnissen hängt unter anderem stark von der Kühlleistung des verwendeten Kühlaggregates, der Gebindegröße und der Beladung der Einfrieranlage ab. Darüber hinaus spielt die Packungsdichte sowie die Position eines Behälters in der Einfrieranlage eine große Bedeutung. Wird ein Einzelbinde in einem

vorgekühlten Gefrierschrank alleine eingefroren, so wird eine viel kürzere Prozesszeit erreicht, als wenn die gesamte Raumkapazität mit ungefrorenem, also noch warmen Produkt beschickt wird. Für diesen Fall ist wiederum zu unterscheiden, ob ein Gebinde von anderen Gebinden umgeben ist, oder irgendwo an eine Wand oder Kühlschlange des Tiefkühlschranks angrenzt. Es ändern sich hierbei nicht nur die Einfriergeschwindigkeit, sondern auch die Form und Richtung der Eisbildung innerhalb des Behälters. Ein einzelner Behälter wird von allen Seiten gleichmäßig von Außen nach Innen durchfrieren, während bei hoher Packungsdichte ein ungleichmäßiger Eisbildungsprozess stattfindet. Mit steigendem Bedarf an biopharmazeutischen Wirkstoffen werden darüber hinaus aus immer größere Ansätze prozessiert.. Häufig werden dann diese Chargen aufgeteilt und nacheinander oder in verschiedenartigen Gefrieranlagen bei unterschiedlicher Beladung eingefroren. Solange jedoch kein signifikanter Produktverlust feststellbar ist, werden diesen Prozessen nur geringe Aufmerksamkeit geschenkt. Wird der Einfrierprozess als Teil eines die Qualität beeinflussenden Herstellungsschrittes angesehen, so müsste aus prozesstechnischer Sicht in Extremfällen die Chargenhomogenität in Frage gestellt werden. Aufgrund der Instabilität verschiedener Proteinlösungen während des Einfrierens sollte der Einfrier- und Auftauprozess möglichst reproduzierbar und nachvollziehbar gestalten werden. Dies könnte auch der Grund für sporadisch auftretende Produktverluste nur einzelner Gebinde sein. Nur so kann höchste Produktstabilität und somit Arzneimittelsicherheit gewährleistet werden.

### 3.2. Anforderungen an Einfrier- bzw. Temperieranlagen für Biopharmazeutika

Bei der Entwicklung eines Einfrier- und Auftausystems, den im vorangehenden Kapitel vorgestellten Gesichtspunkten gerecht, sollte man also folgende Parameter beachten:

#### 3.2.1. *Primärpackmittel*

Die Primärpackmittel sollten neben einer Indifferenz gegenüber dem Produkt auch eine hohe mechanische Stabilität im gesamten Temperaturbereich besitzen. Viele Kunststoffe sind bei tiefen Temperaturen spröde und neigen zur Bruchbildung. Behältnisse aus Teflon und Edelstahl sind aus diesem Grund besonders geeignet. Darüber hinaus können sie gut gereinigt, entpyrogenisiert und sterilisiert werden. Allerdings sind die Beschaffungskosten entsprechend hoch. Ein nicht optimal gelöstes Problem stellt die Dichtigkeit aller Behältnisse bei sehr tiefen Temperaturen von  $-80^{\circ}\text{C}$  dar. Die steriltechnische Dichtheit

von Primärpackmitteln ist hierbei grundsätzlich in Frage zu stellen. Die Behältnisse werden bei Raumtemperatur beschickt und dann eingefroren. Auch wenn diese Behältnisse bei Raumtemperatur dicht sind, stellt sich die Frage, ob die verwendeten Kunststoffdichtringe oder andere Dichtungsmaterialien noch eine ausreichende Flexibilität besitzen, um auch noch steriltechnisch abzudichten. Die Tatsache, dass Keimwachstum bei tiefen Temperaturen weitgehend unterbunden ist, relativiert das Problem. Eine erneute Sterilfiltration direkt nach dem Auftauprozess sollte ausreichend sein.

### *3.2.2. Kälteaggregat / Temperieraggregat*

Das Kälteaggregat sollte ausreichend Kapazität besitzen, um einen zügigen Einfrierprozess innerhalb weniger Stunden zu gewährleisten. Aus Hygienegründen ist es nahe liegend, die befüllten Primärpackmittel noch im Reinraumbereich einzufrieren. Um eine Kontamination des Reinraumbereiches mit toxischen, explosiven oder ölartigen Substanzen zu vermeiden, sollte auch das Kühlmedium sorgfältig ausgewählt werden. Es ist darauf zu achten, dass Kühlmedium, das ja direkt mit dem Primärpackmittel in Berührung kommt, sowohl für das Produkt als auch für den Herstellungsbereich unbedenklich ist, oder in einem geschlossenen Kreislauf gehalten wird.

### *3.2.3. Energieübertragung: Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit*

Mit Hilfe des Temperieraggregates sollte ein kontrolliertes Einfrieren und Auftauen möglich sein, um so einen reproduzierbaren Temperierungsprozess zu gewährleisten. Meist ist es notwendig, einen Herstellungsansatz in mehrere Einzelbehältnisse abzufüllen. Um eine Chargenhomogenität zu gewährleisten, ist es wünschenswert, sämtliche Behälter einem ähnlichen Einfrierprozess, also mit vergleichbaren Temperatur-Zeit Profil abzukühlen. Da das Produkt während des Auftauvorgangs zum Teil den gleichen Stressfaktoren unterliegt wie während des Einfrierprozesses, sollte auch diese Prozessphase möglichst kurz gehalten werden. Ein kontrollierter und gesteuerter Auftauprozess ist zu empfehlen. Da biopharmazeutische Produkte meist thermisch instabil sind, ist während des Auftauvorgangs besondere Vorsicht anzuwenden. Um die Auftaugeschwindigkeit zu erhöhen, muss das  $\Delta T$  zwischen Gefrierpunkt der Produktlösung und Temperiermedium möglichst groß gewählt werden. Die Gefahr einer lokalen Produktüberhitzung am Behältermantel ist zu vermeiden. Dies kann durch Begrenzung der Temperatur des Temperiermediums erreicht werden. Eine Durchmischung durch vorsichtiges Rühren oder Schwenken des bereits zum Teil angetauten Produkts ist hierbei ebenfalls sehr hilfreich.

### 3.2.4. *Praktische Erwägungen*

Während der Entwicklungsphase und auch noch während der Herstellung der ersten Klinikmuster, wird es aufgrund der geringen Volumina keine Notwendigkeit geben, den Abfüll- und Einfrierprozess zu rationalisieren. Im Produktionsmaßstab werden vor allem bei Antikörperlösungen Volumenbereiche erreicht, die eine händische Befüllung der Primärpackmittel sehr aufwendig und zeitintensiv machen, vor allem wenn die Kapazität eines einzelnen Behältnisses nur im Prozent oder Promillebereich der Chargengröße liegt. Eine Automatisierung, d. h. die Verwendung einer Abfüllanlage ist mit erheblichen Investitionen und Unterhaltskosten verbunden. Die einfachste Lösung besteht darin, das Einzelvolumen der Primärpackmittel zu vergrößern. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich damit auch die Prozesszeiten für den Einfrier- und Auftauvorgang stark verlängern, da aufgrund der schlechteren Verhältnisses Oberfläche / Volumen der Wärmeübergang auf das Produkt verschlechtert. Zudem sollte das Volumen des Primärpackmittels an die für die weitere Verarbeitung, also Endformulierung und Abfüllung) benötigte Ansatzgröße angeglichen werden, um so unnötig häufiges Einfrieren und wieder Auftauen des Produktes zwischen den Teilentnahmen zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei neuartigen Einfrieranlagen gearbeitet, welche die genannten Belange weitgehend erfüllen.

## 4. Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Faktoren zu ermitteln, die die Stabilität von Proteinlösungen während des Einfriervorgangs im industriellen Großmaßstab beeinflussen, um so allgemeine Aussagen zur Stabilisierung der Proteinlösungen ableiten zu können.

- A) Als Referenzsystem sollte ein neuer industrieller Prototyp einer Einfrier- und Auftauanlage dienen. Diese Temperieranlage (im späteren auch KVS-Anlage oder Temperieranlage genannt) weist die Besonderheit auf, dass sowohl während des Einfrier- als auch Auftauprozesses die Proteinlösung einer permanenten Rührbewegung unterworfen ist. Die erste Aufgabe lag in der erfolgreichen Qualifizierung der Anlage.
- B) Durch systematische Stabilitätsuntersuchungen an 5 marktrelevanten therapeutischen Proteinlösungen in dieser Anlage sollten während des Einfrierens und Auftauens die systembedingten Vor- und Nachteile genau

ermittelt werden. Bei Bedarf sollte eine Optimierung des Prozesses durchgeführt und so eine Stabilisierung erreicht werden. Im Falle einer erkennbaren Instabilität sollte diese genauer untersucht und der Grund ermittelt werden, um so eine Vorschläge zur Stabilisierung machen zu können.

- C) Als Vergleich diente ein Scale-Down Systems eines bereits auf dem Markt etablierten Einfriersystems. In diesem wurden vergleichende Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt.
- D) Der letzte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung für einen monoklonalen Antikörper. Dieser weist in der bisherigen Pufferlösung eine deutliche Aggregationstendenz nach dem Einfrieren auf. Ziel war es, durch verschiedene Veränderungen der Pufferzusammensetzung eine Stabilisierung zu erreichen und anschließend einen Scale Up des Verfahrens in den industriellen Großmaßstab durchzuführen. Der Antikörper sollte selbst nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen in der KVS-Anlage eine hohe Stabilität aufweisen und somit die Freigabekriterien hinsichtlich Reinheit und biologischer Aktivität erfüllen.

### **Problemfelder der Arbeit**

Eine Hauptproblematik der Arbeit bestand darin, dass verschiedene Stressfaktoren während Einfrier- und Auftauvorgangs nicht isoliert betrachtet werden können. Jeder Einfrierprozess ist stets mit einem Auftauprozess verbunden, da Proteinlösungen nur im flüssigen Zustand untersucht werden können. Ein Gefrierprozess ist sowohl mit Kälte als auch Eisbildung und Konzentrationsphänomenen verbunden. Diese Konzentrationsphänomene während des Einfrierprozesses sind nach dem Auftauen nicht mehr oder nur noch geringfügig nachweisbar.

Daher war die Art der Probenahme von großer Bedeutung. Bei der Probenahme in gefrorenem Zustand ist meist mit einer Beeinträchtigung der Proteinstabilität zu rechnen. Es musste also zuerst eine geeignete Methode entwickelt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden meist unter realen Produktionsbedingungen, also auch im Produktionsmaßstab durchgeführt. Der hierfür nötige Arbeitsaufwand in Bezug auf Probenvorbereitung und Herstellung ist ungleich größer als im Labormaßstab.

Die für diese Versuche notwendigen Mengen an Proteinlösung lagen in einem Größenbereich, der eine Wiederholung eines Experiments mit neuer Produktlösung in den meisten Fällen mangels ausreichender Proteinmenge nicht möglich machte. Somit musste jeder Versuch detailliert geplant und nach Vorversuchen fehlerfrei durchgeführt werden.

## II. Material und Methoden

### 1.1. Materialien

#### 1.1.1. *Interferon alfa-2a Bulklösung*

Interferon- $\alpha$ -2a ist ein aus 165 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einem Molekulargewicht von 19.237,2 Dalton. Das Molekül enthält zwei Disulfid-Brücken zwischen den Aminosäuren in Position 1 und 98 sowie 29 und 138. Es besitzt fünf Tyrosin- und zwei Tryptophan-Reste. Es wird rekombinant von gentechnisch veränderten *E. coli* Bakterien, die codierende DNA für das humane Protein enthalten hergestellt. Da das Interferon alfa-2a in *E. coli* hergestellt wird, ist die Aminosäure Threonin<sub>106</sub> im Gegensatz zum natürlichen Protein nicht glycosyliert.

Interferon alfa-2a wird von einem Gen mit 958 Nukleotiden codiert. Die Gensequenz entspricht exakt der cDNA-Sequenz, da das Gen keine Introns besitzt. Während die ersten 60 Nukleotide nicht translatiert werden, folgt dann das Initiations-Codon Methionin. Das Signalpeptid, das aus den ersten 23 Aminosäuren besteht, sorgt dafür, dass die Proteinsynthese am Endoplasmatischen Retikulum abläuft. Das reife, von der Zelle sezernierte IFN alfa-2a enthält diese Aminosäuren nicht mehr. Die Nukleotide 625-658 am 3'-Ende des Gens werden wiederum nicht translatiert. Somit endet der codierende Genbereich am Nukleotid 624.

IFN-alfa-2a wird aufgrund seiner antitumoralen Aktivität zur Behandlung von Haarzellleukämie und dem bei AIDS-Patienten auftretende Kaposi-Sarkom eingesetzt. Darüber hinaus zeigt es antivirale Aktivität und ist zur Behandlung von Hepatitis B und C zugelassen.

Die Interferon alfa-2a Bulklösung wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, für die Versuche zur Verfügung gestellt. Interferon war in einem Puffer aus 25 mM Ammoniumacetat, 120 mM Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 5.0 gelöst. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 1.0 und 2.0 mg/mL. Die genaue Konzentration ist bei der jeweiligen Versuchbeschreibung angegeben.

### 1.1.2. *Peginterferon alfa-2a Bulklösung*

Peginterferon alfa-2a (PEG-IFN) ist ein mit Polyethylenglykol modifiziertes Interferon alfa-2a (IFN). Es besteht aus einem verzweigten ~40 kDa Polyethylenglykolmolekül, das kovalent mittels Amidbindung an das Interferon gebunden ist. Das reaktive PEG Reagens besteht aus zwei ~20kDa Monomethoxy-PEG (mPEG) Ketten, die über die  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinmoleküls mittels Urethanbindung miteinander verbunden sind. Die Carboxylgruppe des Lysins wird zu einem N-Hydroxysuccinimidester funktionalisiert und reagiert mit den Lysin-Resten an den Positionen Lys-23, -31, -49, -70, -83, -112, -121, -131, -133, -134 des Interferons unter Bildung eines Amids (Abbildung II-1). Das typische Molekulargewicht des Pegylierungsreagens wurde mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie mit 43 kDa bestimmt. Die Kettenlänge der Ethylenoxid Einheiten variiert zwischen  $n=460$  bis 520.

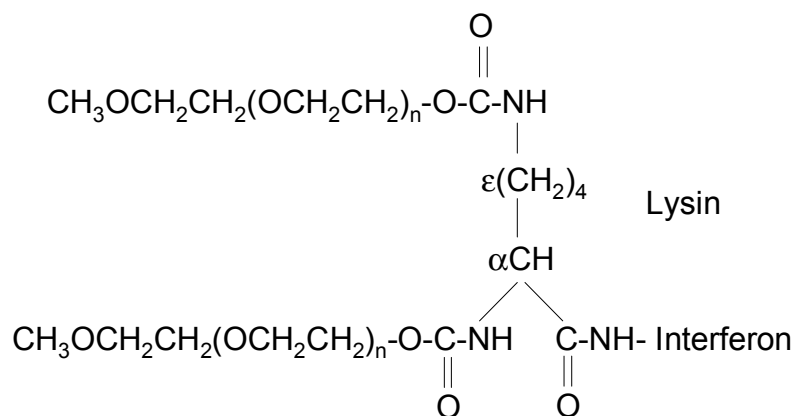
Das Molekulargewicht von Peginterferon alfa-2a beträgt somit ~63 kDa. Peginterferon hat vorwiegend eine Polyethylenglykol-Seitenkette pro Interferonmolekül, als Nebenprodukte werden jedoch auch höher substituierte Produkte gebildet. Häufigster Angriffspunkt der Pegylierungsreaktion sind die Lysin-Reste Lys-31, -121, -131 und -134. Die Peginterferon Bulklösung enthält weniger als 5% höher substituiertes di-PEG-IFN (zwei ~40kDa-Seitenketten) oder oligo-PEG-IFN (mehr als zwei ~40kDa Seitenketten). Die PEG-IFN Bulklösung wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, zur Verfügung gestellt. Das pegylierte Protein war in einem Puffer aus 20 mM Natriumacetat, pH 6.0 mit 50 mM Natriumchlorid gelöst. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 1.0 und 2.0 mg/mL.

Der Grund für die Pegylierung des Interferons ist vor allem in therapeutischen Vorteilen gegenüber dem nativen Protein zu finden. Infolge einer deutlich verlängerten Plasmahalbwertszeit können eine höhere Patienten-Compliance, verringerte Nebenwirkungen und höhere Wirksamkeit aufgrund gleichmäßigerer Blutplasmakurven erzielt werden. Nach enzymatischer Abspaltung der PEG-Reste wird die eigentliche Wirkform Interferon alfa-2a freigesetzt.



**Abbildung II-1**

*Chemische Struktur von verzweigtem PEG in Peginterferon alfa-2a ( $n = 460 - 520$ )*



### 1.1.3. Trastuzumab Bulklösung

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das HER2-Protein (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2) gerichtet ist. Der Antikörper ist vom murinen Antikörper 4D5 abgeleitet: Die 6 komplementärbestimmenden Regionen des murinen Antikörpers sind auf ein humanes Immunglobulingerüst übertragen. Somit handelt es sich um einen chimären Antikörper (Ig G) mit 95% humanem und 5% murinen Anteil mit einem Molekulargewicht von 145 kDa. Trastuzumab wird im kontinuierlichen Durchflussverfahren aus den Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) gewonnen. Das HER2 Protein wird bei 25 bis 30% der Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom überexprimiert. Wenn es im Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden kann, ist das Risiko für einen besonders aggressiven Verlauf der Krankheit hoch. Tumorzellen mit diesem Kennzeichen sprechen gegenüber konventionellen Chemo- und Hormontherapien schlecht an. Der Antikörper blockiert HER2-Proteine auf der Zelloberfläche, so dass die Zelle von diesen keine Wachstumssignale mehr erhält. Außerdem kann der Antikörper-Rezeptor-Komplex auf der Zelloberfläche von körpereigenen zytotoxischen T-Killerzellen angegriffen werden, wodurch die entartete Zelle zerstört wird. Im Gegensatz zur Chemo- und Hormontherapie erreicht der Antikörper auch ruhende Zellen, die sich nicht teilen. Auf diese Art soll er Mikrometastasen zerstören, die in verschiedenen Gewebe oder im Knochenmark disseminiert sind. Diese vom Immunsystem unerkannten Mikrometastasen können nach einigen Jahren Ruhe wieder zu wachsen beginnen und somit manifeste Metastasen bilden.

Im Gegensatz zu einer Chemotherapie zerstört der Antikörper die normalen und gesunden Zellen nicht. Damit kommt es zu wesentlich weniger Nebenwirkungen als bei herkömmlichen Krebstherapien. Trastuzumab kann als Monotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel die Lebensdauer bei HER2-überexprimierenden Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom deutlich verlängern.

Das HER2-Gen ist ein so genanntes Proto-Onkogen. Unter normalen Bedingungen produzieren die beiden Kopien des HER2-Gens im Zellkern geringe Mengen des HER2-Proteins, das zur Familie der menschlichen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehört. Dieses Protein hat eine Bedeutung bei der Übertragung von Wachstumssignalen, die für ein kontrolliertes Zellwachstum mit geregelter Teilungsrate sorgen. Es ragt aus der Oberfläche der Zellen hervor, welche die wachstumsfördernden Signale überträgt. Entartete Zellen weisen häufig einen bis zu hundertfachen Überschuss dieses Proteins auf. Die Zelle reagiert mit unkontrolliertem Wachstum und vermehrter Teilung.

Zur Zeit ist Trastuzumab für die Behandlung von HER2-überexprimierenden Formen des metastasierenden Brustkrebses zugelassen. Diskutiert wird, ob der Antikörper grundsätzlich dann eingesetzt werden kann, wenn die Überexpression des HER2-Gens nachgewiesen wird.

Die Trastuzumab Bulklösung wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, erhalten. Der Antikörper war in einem Puffer bestehend aus 5 mM Histidin-HCl, pH 6.0, 0.02 % (m/V) Polysorbat 20 und 60 mM Trehalose gelöst.

#### *1.1.4. Daclizumab Bulklösung*

Daclizumab wird zur Prophylaxe akuter Abstoßungsreaktionen nach allogener Nierentransplantation zusammen mit einer immunsuppressiven Standardtherapie (Ciclosporin, Corticoide) an noch nicht hochimmunisierten Patienten angewendet.

Daclizumab ist ein rekombinanter, humanisierter IgG<sub>1</sub>-anti-Tac-Antikörper, der als Interleukin-2-(IL-2)-Rezeptor-Antagonist wirkt. Daclizumab bindet mit hoher Spezifität an die Alpha- oder Tac-Untereinheit des hochaffinen IL-2-Rezeptor-Komplexes (der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird) und hemmt die IL-2-Bindung und damit die biologische Aktivität des Moleküls. Dies führt zu einer Hemmung der IL-2-vermittelten Lymphozytenaktivierung, die bei der Abstoßungsreaktion eines allogenen Transplantats eine entscheidende Rolle spielt.

---

Der monoklonale Antikörper, MAK<IL2-R-P55> rH-IgG, wird in SP20-Zellen exprimiert. Nach Ernte des Fermenters werden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und der zellfreie, produkthaltige Kulturüberstand mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Als weitere Aufreinigungsstufen folgen Ionenaustauscher- und hydrophobe Chromatographie. Konzentrierungen und Umpufferungen von Prozesszwischenstufen erfolgen mittels Tangential Fluss Filtration (TFF).

Daclizumab Bulklösung, bestehend aus 67 mM Natriumphosphat pH 6.9, 78,7 mM Natriumchlorid und 6.3 mg/mL Antikörper wurde von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg für die Versuche zur Verfügung gestellt.

### 1.1.5. *Chemikalien und Reagenzien*

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien wurden für die Versuche verwendet:

**Ammoniumacetat 98% reinst,**  
Grüssing GmbH, Filsum

**Ammoniumperoxodisulfat, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Bromphenolblau, Natriumsalz, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Cleland's Reagent, Molecular Biology Grade**  
Calbiochem®, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Ethanol, gradient grade**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Glycin, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Diethylenglykol, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ , p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Kaliumdihydrogenphosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Kaliumhydroxid, KOH, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Natriumchlorid, NaCl, p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , p. A.**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , p. A**  
Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**Saccharose**

Südzucker AG, Mannheim

 **$\alpha$ ,  $\alpha$ - Trehalose Dihydrat**

Pfanstiehl Laboratories, Inc. Waukegan, USA

**Reinstwasser**

Reinstwasser wurde aus einer Anlage des Typs Purelab Plus® (USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach) gewonnen.

**Tween® 20 pure, Polysorbat 20**

Serva, Heidelberg

**Tween® 80 pure, Polysorbat 80**

Serva, Heidelberg

**Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan, p. A.**

Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

**N., N., N', N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED), p. A.**

Merck GmbH, Darmstadt

## 1.2. Methoden

### 1.2.1. *Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Interferon alfa-2a*

Die Untersuchungen wurden mittels einer HPLC-Anlage der Fa. Dionex (Pumpe P5801 HPG, Autosampler Gina® 50 T, Detector UVD 170 S, Degaser DG-2410) durchgeführt. Als Trennmedium wurde eine Säule TSK-Gel® G2000 SW (7.5 x 600mm) der Fa. Tosoh Biosep verwendet. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 280 nm. Als Fließmittel wurde ein Puffer aus 20 mM Natriumphosphat, 120 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 6.8 verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL bei einer Proteinkonzentration von 0.8 mg/mL. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden analytischen Software unter Verwendung eines Interferon Arbeitsstandards.

### 1.2.2. *Reversed-Phase HPLC von pegyliertem Interferon*

Mit Hilfe der RP-HPLC ist eine Quantifizierung von Peginterferon Monomer und Aggregaten, sowie von mehrfach pegyliertem Interferon (Oligo-Peginterferon) und auch nicht pegyliertem Interferon möglich. Diese Proteinspezies werden in der RP-HPLC aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipophilie getrennt. Verwendet wurde eine Jupiter® 5 µ C18-R 300 A Säule der Fa. Phenomenex. Als Laufmittel wurden ein Gradient aus Laufmittel A (30% Acetonitril, 0.2 % TFA) und Laufmittel B (80 % Acetonitril, 0.2 % TFA) verwendet. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 280 nm. Das Injektionsvolumen betrug 200 µL bei einer Proteinkonzentration von 0.4 mg/mL. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden analytischen Software unter Verwendung eines PEG-IFN Arbeitsstandards.

### 1.2.3. *Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von pegyliertem Interferon alfa-2a*

Zusätzlich zur RP-HPLC kann mittels Gelfiltration die Menge an aggregiertem Protein bestimmt werden. Hierzu wurde eine SEC-Säule vom Typ TSK-Gel® 4000 SW (7.8 x 300mm) der Fa. Tosoh Biosep verwendet. Das Fließmittel setzte sich zusammen aus 150 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphat pH 6.8 sowie 1% Diethylenglykol und 10 % Ethanol. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 280 nm. Das Injektionsvolumen betrug 200 µL bei einer Proteinkonzentration von 0.4 mg/mL. Die

Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden analytischen Software unter Verwendung eines PEG-IFN Arbeitsstandards.

#### 1.2.4. *Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Trastuzumab*

Als Trennmedium wurde eine Säule TSK-Gel® 3000 SWXL (7.8 x 300mm) der Fa. Tosoh Biosep verwendet. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei 280 nm. Als Fließmittel wurde ein Puffer aus 100 mM Kaliumphosphat, pH 6.8 verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden analytischen Software unter Verwendung eines Interferon Arbeitsstandards.

#### 1.2.5. *Größenausschlusschromatographie (SE-HPLC) von Daclizumab*

Die Quantifizierung von monomeren und aggregierten Daclizumab Spezies wurde erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Verwendet wurde eine TSK-Gel® SW XL (7.8 x 300 mm) Säule der Fa. Tosoh Biosep. Das Laufmittel bestand aus 200 mM Kaliumphosphat, 150 mM Kaliumchlorid bei einem pH-Wert von 6.9.. Die Detektion der getrennten Bestandteile erfolgte photometrisch bei  $\lambda = 280$  nm. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/mL. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der entsprechenden analytischen Software unter Verwendung eines Daclizumab Arbeitsstandards.

#### 1.2.6. *Gelelektrophorese von Interferon und Peginterferon Bulkösungen*

Die Proteine wurden nach Denaturierung auf zwei separaten Gelen unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Laufbedingungen im SDS-Polyacrylamidgel anhand ihres Molekulargewichts getrennt und durch Silber-Färbung sichtbar gemacht. Die Gele (16%-ige Novex® Tris-Glycin-Gele, 1.5 mm), der Silberfärbekit (SilverXpress® Silver Staining Kit) sowie die Laufpuffer (Tris-Glycine-SDS-Laufpuffer) wurden von der Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein Molekulargewichtsmarker (Mark<sup>TM</sup> 12), als Referenz wurde eine Arbeitsstandard (Interferon alfa-2a oder Peginterferon alfa-2a) verwendet. Das Gel wurde hinsichtlich Nebenbanden, die durch Fragmente oder irreversible Aggregate verursacht werden konnten, untersucht.

### 1.2.7. Gelelektrophorese von Trastuzumab und Daclizumab Bulklösung

Die Proteine wurden nach Denaturierung mit SDS im SDS-Polyacrylamidgel anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und die Proteinbanden durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Das Gel wurde hinsichtlich Nebenbanden, die durch Fragmente oder irreversible Aggregate verursacht werden konnten, untersucht. Die Gele (10%-ige Novex® Tris-Glycin-Gele, 1.5 mm), der Silberfärbekit (SilverXpress® Staining Kit) sowie die Laufpuffer (Tris-Glycine-SDS-Laufpuffer) wurden von der Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein Molekulargewichtsmarker (Mark™ 12), als Referenz wurde eine Arbeitsstandard (Daclizumab bzw. Trastuzumab) verwendet.

Die Gele wurden elektronisch eingescannt und mittels Biometra ScanPack® 3.0 Software ausgewertet.

### 1.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration von Interferon Bulklösung

Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins beträgt  $1.0 \left[ \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}} \right]$ . Für die Gehaltsbestimmungen wurde ein Photometer des Typs Hitachi U-1100 verwendet. Die Proteinkonzentration nach einer Verdünnung um den Faktor F errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mg/mL]} = \frac{E_{280} - E_{320}}{1.0} \times F$$

### 1.2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration von Peginterferon Bulklösung

Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins beträgt  $1.04 \left[ \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}} \right]$ . Für die Gehaltsbestimmungen wurde ein Photometer des Typs Hitachi U-1100 verwendet. Die Proteinkonzentration nach einer Verdünnung um den Faktor F errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mg/mL]} = \frac{E_{280}}{1.04} \times F$$



*1.2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration (Gesamtproteingehalt) von Trastuzumab Bulklösung*

Die Konzentration des Antikörpers wurde photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins beträgt  $1.5 \left[ \frac{mL}{mg \times cm} \right]$ . Für die Gehaltsbestimmungen wurde ein Photometer des Typs Hitachi U-1100 verwendet. Die Proteinkonzentration nach einer Verdünnung um den Faktor F errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mg/mL]} = \frac{E_{280} - E_{320}}{1.5} \times F$$

*1.2.11. Bestimmung der Proteinkonzentration von Daclizumab Bulklösung*

Die Konzentration des Antikörpers wurde photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins beträgt  $1.34 \left[ \frac{mL}{mg \times cm} \right]$ . Für die Gehaltsbestimmungen wurde ein Photometer des Typs Hitachi U-1100 verwendet. Die Proteinkonzentration nach einer Verdünnung um den Faktor F errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mg/mL]} = \frac{E_{280} - E_{320}}{1.34} \times F$$

### 1.2.12. DSC-Messungen

Zur thermodynamischen Charakterisierung der Proben bezüglich  $T_g'$  und Eutektika wurde ein DSC 204 Gerät der Fa. Netzsch verwendet. Die Gerätekomponenten sind unten stehend aufgeführt. Als Kältemedium diente flüssiger Stickstoff LN2 (Messer, Greisheim). Die Probenmasse betrug 20 mg. Die Proben wurden in Aluminiumtiegel (Netzsch) eingebracht und mit einer Universalschlusspresse (Netzsch) dicht verschlossen.

DSC-Gerät:	Netzsch DSC 204 Phoenix, Netzsch GmbH, Selb, Deutschland
Sensor:	DSC 204 t-sensor /E
Modus/Messart:	DSC / Probe
Atmosphäre:	N2
Temperaturbereich:	-80°C bis +20°C
Pan:	Pan Al, pierced lid
Referenz-Pan:	Pan Al, pierced lid

Der Messbereich wurde von -80°C bis +20°C gewählt, die Auswertung beschränkt sich auf den Bereich zwischen -70°C und 0°C. Die Auswertung erfolgte mittels Netzsch Proteus Thermal Analysis Software-Version 4.1.2.

Hinsichtlich eutektischer Punkte wurde der Peak-Onset und Peak-Temperatur bestimmt. Der Peak-Onset ist Abszisse des Schnittpunktes der Kurventangenten am Wendepunkt und vor dem Wendepunkt. Die Peak-Temperatur ist die Abszisse des Peak-Maximums. Eine quantitative Auswertung der Peakflächen oder Peakhöhen wurde nicht durchgeführt. Die Darstellung wurde so gewählt, dass exotherme Reaktionen als negative, endotherme als positive Peaks in den Messkurven dargestellt werden.

Der Glasübergang  $T_g'$  ist durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf infolge der charakteristischen  $\Delta C_p$  Änderung gekennzeichnet. Der Onset des Glasübergangs sowie die Halbumwandlungstemperatur  $T'_{g1/2}$  wurden zur Charakterisierung von  $T_g'$  bestimmt. Die Halbumwandlungstemperatur  $T'_{g1/2}$  stellt hierbei die Ordinate des Wendepunkts der Kurve dar.

### 1.2.13. Diafiltration und Diakonzentration von Interferon Bulklösung

Diafiltrations- und Diakonzentrationsschritte wurden mittels Millipore Ultrafree®, Biomax® 5K NMWL Membran (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einer gekühlten Zentrifuge (+4°C) bei 2000 g zentrifugiert. Durch die verwendeten Verfahrensschritte konnte die Konzentration der in

der Ausgangslösung enthaltenen Pufferkomponenten auf weniger als 0.1 % des Ausgangswertes reduziert und durch Diafiltrationspuffer ersetzt werden.

#### 1.2.14. *Diafiltration und Diakonzentration von Daclizumab Bulklösung*

Daclizumab wurde mit Hilfe einer Millipore Pellikon® L-Cassettes (30 kDa, 0.5 m<sup>2</sup>) aufkonzentriert und mittels Tangential Fluss Filtration umgepuffert. Das Volumen des Diafiltrationspuffers war um den Faktor 10 größer als das Ausgangsvolumen.

#### 1.2.15. *Filtrationen (0.2 µm)*

Zur Partikel und Keimzahlreduktion wurden Filtrationsschritte (0.2 µm mittlere Porenweite) von Proteinlösungen durchgeführt. Bei sämtlichen Versuchen fanden zwei verschiedene Filtertypen Verwendung. Im Labormaßstab (unter 1 L Gesamtvolumen) wurden Spritzenvorsatzfilter der Fa. Sartorius AG, Göttingen (Minisart®, Celluloseacetat Membran, Sterile-EO, non-pyrogenic) verwendet. Filtrationen im Großmaßstab wurden mit Kleenpack™ Fluorodyne®, Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF), Filterkerzen der Fa. Pall Corporation, USA und einer Schlauchquetschpunkte durchgeführt.

#### 1.2.16. *Partikelmessung*

Unter Partikelkontamination von Injektions- und Infusionslösungen werden fremde, bewegliche, ungelöste Partikel, die unbeabsichtigt in den Lösungen vorhanden sind, mit Ausnahme von Gasbläschen, verstanden. Die Ursache für die Verunreinigung von Parenteralia mit Partikeln kann verschiedenen Ursprungs sein. Häufige Quelle von Partikeln sind Verunreinigungen und Absonderungen oder Absplitterungen von Primärpackmitteln. Allerdings können Partikel auch Produkte von Inkompatibilitätsreaktionen oder Instabilitäten sein. Die in dieser Arbeit durchgeführten Partikelmessungen dienen zum Nachweis letzterer Spezies. Intention der Messung war nicht die Quantifizierung der genauen Anzahl an Schwebeteilchen, sondern der Nachweis von Tendenzen, die mit dem bloßen Auge noch nicht feststellbar, oder nicht quantifizierbar sind.

Für die Messungen wurde ein Lichtblockade Gerät der Fa. Partikelmess- und Analysesysteme GmbH, Rutesheim, (PAMAS – SVSS-C, Sensor HCB-LD-25/25) verwendet. Das Mindestanalysevolumen betrug 0.5 mL, wobei zur Auswertung der Mittelwert aus drei Einzelmessungen gebildet wurde.

Lösungen, deren Partikelzahl über 100 000 lag wurden in einer Verdünnung in dem entsprechenden Puffermedium (0.2 µm filtriert) vermessen. Sämtliche Proben waren kurz

vor der Messung auf Raumtemperatur erwärmt und mindesten 5 Minuten in einem Exsikkator bei Unterdruck gelagert. Anschließend wurden die Proben nochmals vorsichtig geschwenkt, um eine Partikelsedimentation zu verhindern. Diese Verfahrensschritte gewährleisteten eine ausreichende Elimination von Gasbläschen.

Sämtliche Partikelangaben beziehen sich auf ein Volumen von 1 mL und sind kumulativ wiedergegeben. Die Auswertung wurden mit Hilfe der Software PMA – Partikel Mess- und Analyseprogramm Version 1.28 (Fa. Pamas GmbH) durchgeführt.

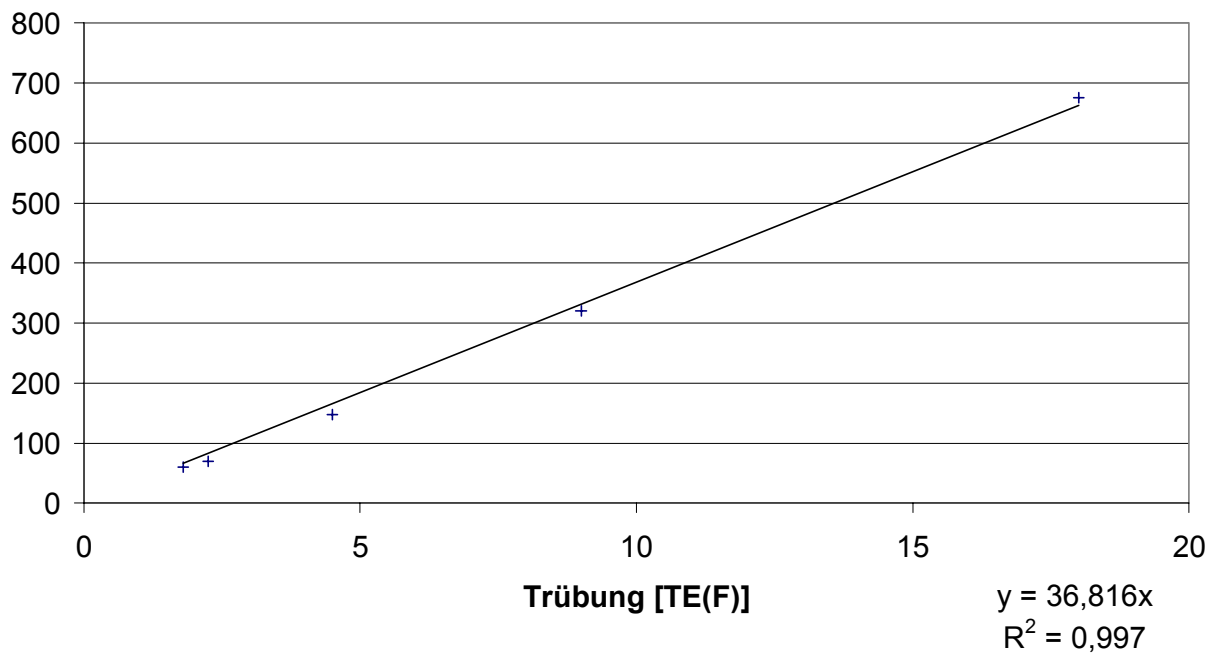
#### 1.2.17. Trübungsmessung

Die Trübungsmessungen wurde mit Hilfe eines Cary® Eclipse Fluorescence Spectroscopy Varian Inc., Palo Alto, durchgeführt; es handelte sich um eine 90° Streulichtmessung bei einer Emissions- und Detektionswellenlänge von 320 nm. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe eines Formazin-Standards der Fa. Hach Company, Düsseldorf, verwendet (Abbildung II-2).

### Abbildung II-2

*Kalibriergerade einer Verdünnungsreihe von Formazin zur Streulichtmessung 90° bei 320 nm*

**Streulicht 90°  
[mV]**



### *1.2.18. pH-Wert Bestimmungen und Einstellungen*

Die pH-Wert Messungen und Einstellungen wurden mit einem Mettler Toledo MP 220 pH-Meter bei Raumtemperatur  $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  und einer pH-Elektrode vom Typ Mettler Toledo InLab® 410 pH durchgeführt. Das pH-Meter wurde bei  $20^{\circ}\text{C}$  mit Hilfe von zertifizierten Standard-Referenz-Pufferlösungen (pH 4.00, 7.00 und 11.00 Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) kalibriert.

### *1.2.19. pH-Shift Messungen*

Die Bestimmung der pH-Wert Veränderung während des Einfriervorgangs wurde mit Hilfe eines Knick Prozess-pH-Meter 73 pH und einer Mettler Toledo InLab® 428 Elektrode durchgeführt. Zur Temperaturkompensation diente ein PT-100 Temperatursensor, der an der Elektrode angebracht und an dem Prozess-pH-Meter angeschlossen war. Das pH-Meter wurde bei  $+20^{\circ}\text{C}$  und  $+10^{\circ}\text{C}$  und  $0^{\circ}\text{C}$  mit Hilfe von zertifizierten Standard-Referenz-Pufferlösungen (pH 4.00, 7.00 und 11.00, Merck Darmstadt) kalibriert.

Zur Versuchsdurchführung wurde die Probelösung in einem 50 mL Falcon-Röhrchen in einem Kältebad langsam auf  $-25^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und der pH-Wert in Abhängigkeit der Temperatur aufgezeichnet. Jede Messung wurde mindestens zweimal wiederholt und der Mittelwert gebildet.

### *1.2.20. Leitwertmessung*

Der Leitwert der Lösungen wurde nach dem vollständigen Auftauen in einer Verdünnung mit Reinstwasser ( $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) vermessen. Verwendet wurde ein Konduktometer inoLab® Cond Level 2 der Fa. WTW GmbH & Co. KG, Weilheim. Zuvor wurde für den zu vermessenden Puffer eine Kalibriergerade erstellt.

## 2. Einfriersysteme

### 2.1. CryoFin™ -System von Integrated Biosystems

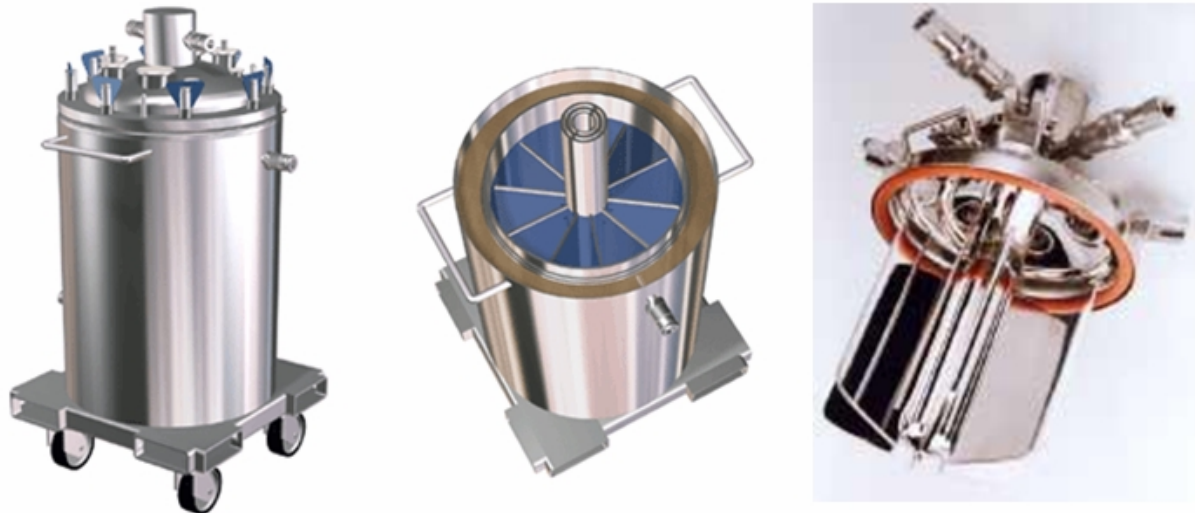
Die Firma Integrated Biosystems bietet ein Large-Scale Einfriersystem an, das aus einem Produktbehälter, einem Cryostaten, einem Bodenschüttler und einem PC-System zur Steuerung der Einzelkomponenten besteht. Die Besonderheit dieses Systems besteht darin, dass der große Produktbehälter mit Hilfe von radial angeordneten Metallfinnen (Abbildung II-3 Mitte) in mehrere kleinere Segmente geteilt wird. Im Zentrum des Behälters, dort wo alle Finnen aufeinander treffen, befindet sich ein Leitungssystem, durch das Kühlmittel mit definierter Temperatur geleitet wird. Als Kältequelle dient ein prozessorgesteuertes Kälteaggregat. Auch der Behältermantel ist thermostatisiert. Abbildung II-3 zeigt einen Querschnitt durch einen mit „CryoFinnen“ ausgestatteten Behälter. Dadurch soll ein gleichmäßiges dendritisches Eiskristallwachstum in die Produktlösung erreicht werden.

Mit Hilfe dieses Konzeptes sollen Entmischungsvorgänge insbesondere durch die Minimierung von Konvektionsbewegungen reduziert werden.

Das System kann auch zum Auftauen der Produktlösung genutzt werden. Das Kühlmittel wird zu diesem Zweck erwärmt. Nachdem die Produktlösung den Gefrierpunkt erreicht hat und ausreichend flüssige Anteile vorhanden sind, wird der gesamte Behälter durch einen Bodenschüttler bewegt. Damit wird eine Beschleunigung des Auftauprozesses sowie eine permanente Homogenisierung erreicht. Für verschiedene Volumenbereiche werden unterschiedliche Behältergrößen angeboten.

**Abbildung II-3**

*CryoVessel<sup>TM</sup> (links), Querschnitt durch einen CryoVessel<sup>TM</sup> (Mitte) und Fotografie des CryoFins<sup>TM</sup> (rechts)*



*2.1.1. Scale-Down System – CryoPilot<sup>TM</sup> – A*

Die Fa. Integrated Biosystem bietet für Versuchszwecke ein Scale-Down System namens CryoPilot<sup>TM</sup> an. Dieses besteht aus vergleichbaren Komponenten die jedoch für eine deutlich geringere Kapazität ausgelegt sind. Der Produktbehälter ist nicht eine maßstabsgetreue Verkleinerung der großen CryoVessel<sup>TM</sup>, sondern besteht aus einer einzelnen Produktzelle, also einem Segment des großen Produktbehälters. Dieses CryoWedge<sup>TM</sup> zeigt eine vergleichbare Eisbildungslinie und Temperaturgradienten wie der zugehörige CryoVessel<sup>TM</sup>. Es werden für jede Größe des CryoVessel<sup>TM</sup> ein entsprechendes CryoWedge<sup>TM</sup> mit identischem Radius und Segmentgröße angeboten.

**Abbildung II-4**

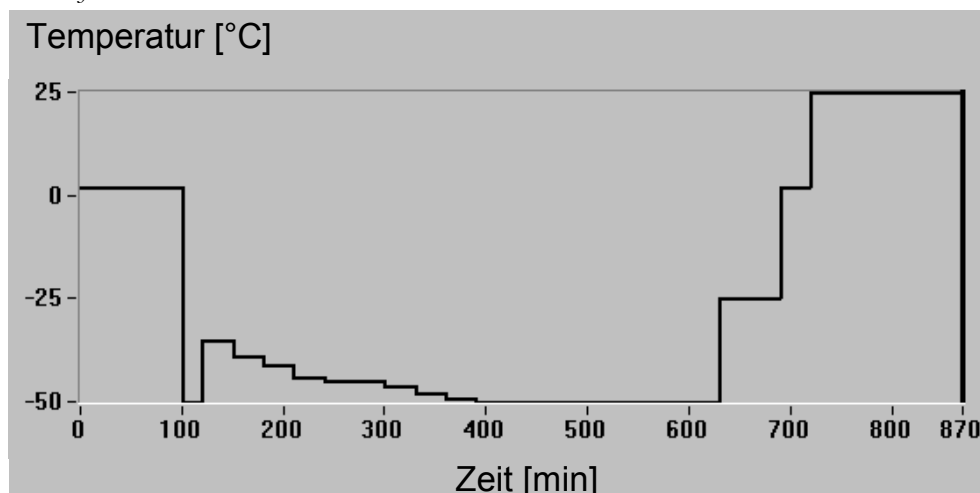
*CryoPilot™-A System von Integrated Biosystems*



Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit dem CryoPilot™ – A System (Abbildung II-4), bestehend aus einem 20-Zoll CryoWedge™, einem Huber Unistat 360, IKA HS501 digital Horizontalschüttler und einem Windows™ basiertem Laptop, durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgt mittels der zugehörigen System Software. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde das von Integrated Biosystems entwickelte „20-Zoll Golden Standard“ Einfrier- und Auftaurezept (Abbildung II-5) verwendet.

**Abbildung II-5**

*Graphische Darstellung des Einfrier- und Auftaurezeptes von Integrated Biosystems. Die Linie gibt den zeitlichen Verlauf des Kühlmittelsollwertes wieder.*



### 2.1.2. Theoretische Betrachtungen zum Integrated Biosystem CryoFin™-Concept

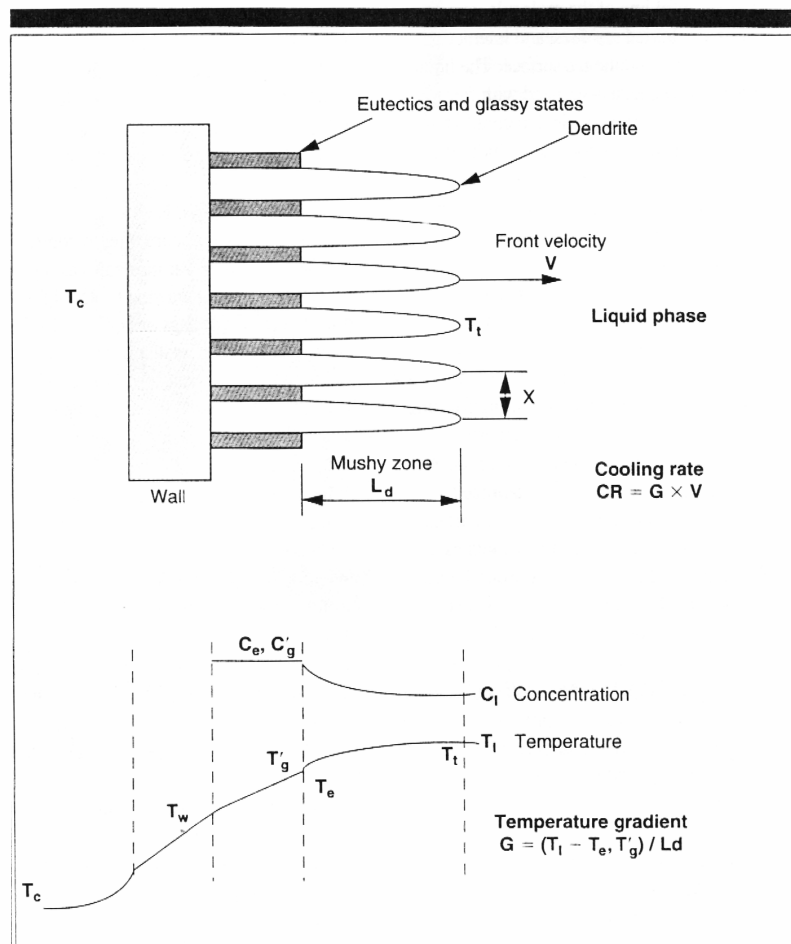
Die Funktion dieser Cryofinnen soll anhand des Kristallisationsprozess etwas genauer betrachtet werden. Wässrige Lösungen frieren im Allgemeinen von außen nach innen



durch. Betrachtet man jedoch die Front der Eiskristalle, die in die Lösung hineinwachsen, stellt man fest, dass es sich nicht um eine glatte, flache Linie, sondern um eine dendritisch geformte, also fingerähnlich gezackte Front handelt [26, 41, 119]. Während diese dendritischen Kristalle aus nahezu reinem Eis bestehen, befinden sich die Lösungsbestandteile (Elektrolyte, Proteine) im interdendritischen Spalt, also dem Raum zwischen diesen Eiskristallen und können dort ein Eutektikum oder einen glasartigen Zustand bilden [17]. Abbildung II-6 veranschaulicht schematisch das dendritische Kristallwachstum. Sowohl zu schnelle als auch zu langsame Kühlraten haben negative Auswirkungen auf das Kristallwachstum. Das CryoFin<sup>TM</sup>-System wird laut Hersteller mit einer definierten, empirisch ermittelte Einfriergeschwindigkeit betrieben, die das dendritische Kristallwachstum verstärken soll, um so natürliche Konvektionsbewegungen einzuschränken.

### Abbildung II-6

*Dendritisches Eiskristallwachstum mit Protein und anderen Lösungsbestandteilen; Temperatur und Konzentrationsverlauf [43]*



## 2.2. Die KVS-Temperieranlage

Die Fa. KVS-GmbH, Marburg entwickelte in Zusammenarbeit mit der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, ein Einfriersystem für Proteinlösungen im Großmaßstab. Dieses als Temperieranlage bezeichnete System besteht aus einem Edelstahlschrank, einer Steuereinheit und einem Windows basierten Personal Computer.

### 2.2.1. *Mechanischer Aufbau*

Der Einfrierschrank besteht aus einer Produktkammer und einem Zirkulationsumluftsystem. Das Produkt selbst ist nochmals in Edelstahlbehälter mit einem maximalen Befüllvolumen von 15 L Proteinlösung abgefüllt, die in der Produktkammer liegen (Abbildung II-7). Zur Erhöhung des Wärmeübergangs zwischen Kältemedium ( $\text{LN}_2$ ) und Produkt ist das System mit einem Zirkulationslüfter ausgestattet. Dieser saugt Luft bzw. Stickstoff aus dem Bodenbereich der Produktkammer ab, führt diese über eine integrierte Elektroheizung und verteilt sie dann mittels eines komplexen Rohrsystems gleichmäßig auf alle Produktbehälter. Als Kältequelle dient flüssiger Stickstoff, der über eine Leitung in das Zirkulationssystem der Anlage eingespeist wird.

Das Primärpackmittel besteht aus Edelstahlbehältern mit einem Bruttovolumen von 29 L. Diese sind auf Teflonrollen drehbar gelagert und sind während des Einfrier- und Auftauprozesses einer permanenten oszillierenden Drehbewegung unterworfen. Nach jeweils drei vollständigen Umdrehungen ändert sich die Drehbewegung. Diese oszillierende Drehung (drei vollständige Rotationen pro Minute) ermöglicht die Ausstattung der Behälter mit Temperaturfühlern, ohne dass diese verdreht werden und schließlich abreißen. Der Behälterantrieb erfolgt über eine mechanische Kopplung am Containerboden auf die Behälterantriebswelle an der Rückwand der Produktkammer. Die Edelstahlbehälter liegen in einem Winkel von  $6^\circ$  zur Horizontalen im Temperierschrank.

Insbesondere zu Beginn eines Einfrierprozesses kommt es zu einer schlagartigen Expansion des flüssigen Stickstoff, wenn dieser in die warme Produktkammer eingespeist wird. Da der Edelstahlschrank nicht als Überdruckkammer ausgelegt ist, muss der entstehende Überdruck mittels eines Abluftsystems abgeleitet werden.

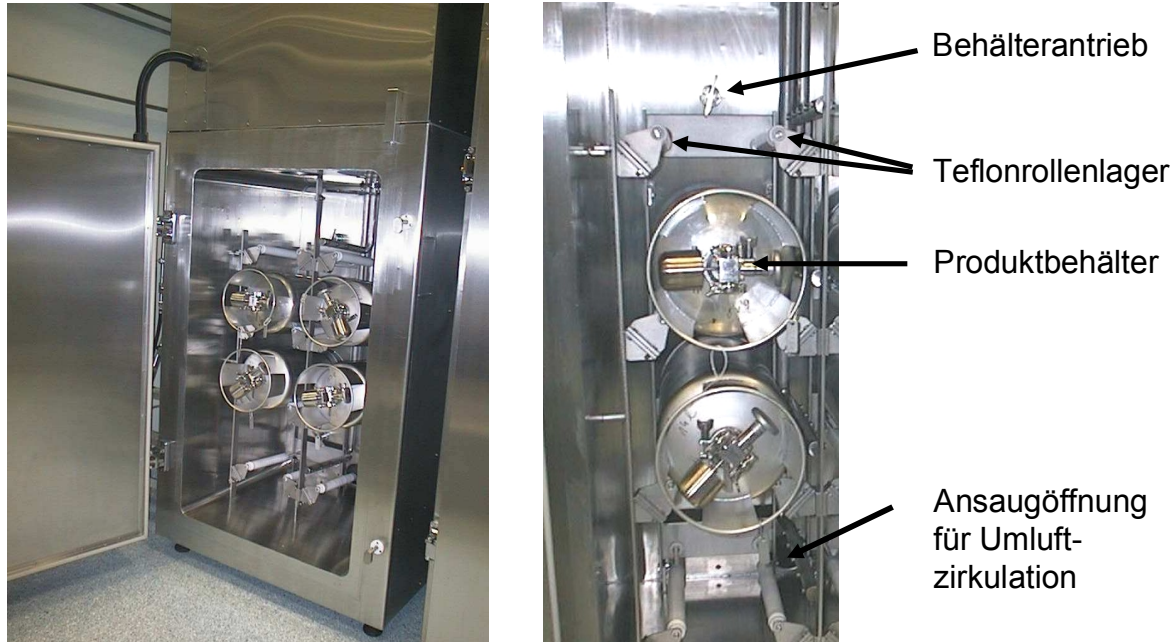
Die Produktkammer ist über einen automatischen Verschlussmechanismus abgesichert, der ein versehentliches Öffnen der mit Stickstoff gefluteten Kammer verhindert. Erst wenn der Sauerstoffgehalt im Schrankinneren nach Einleiten von Druckluft einen bestimmten Wert überschritten hat, öffnet sich die Schranktüre vollautomatisch.

**Abbildung II-7**

*Fotographie der KVS-Temperieranlage.*

*Links: Vier Edelstahlbehälter liegen in der KVS-Temperieranlage*

*Rechts: Vergrößerte Darstellung der mechanischen Bauteile für Behälterantrieb und Rollenlagerung*



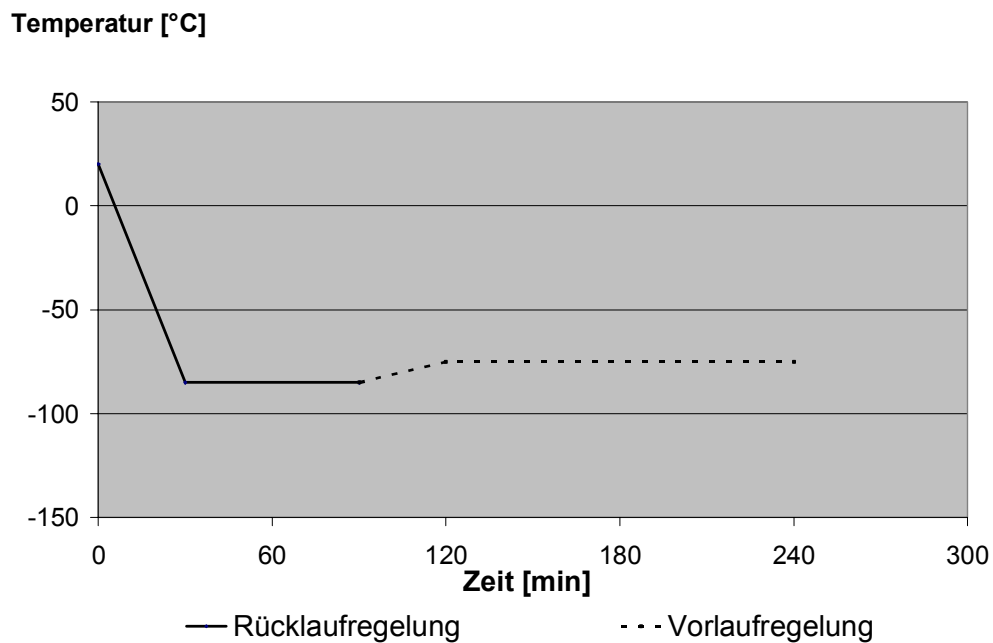
### 2.2.2. Temperatursteuerung der KVS-Temperieranlage

Die Temperatur der Temperierschrankkammer kann mittels zweier Temperatursensoren (PT-100) genau kontrolliert werden. Während der erste Sensor (Vorlauftemperaturfühler) die Temperatur des in den Schrank eingeleiteten Stickstoffs misst (Vorlauftemperatur), erfasst der zweite Sensor (Rücklauftemperatursensor) die aus dem Schrank in das Umluftsystem wieder abgesaugte Luft (Rücklauftemperatur). Hierbei kommt es systembedingt zu einem sehr starken Überschwingen der Vorlauftemperatur. Während des Auftauens wird die Temperatur ausschließlich nach dem Vorlauffühler geregelt, um so die in den Schrank eingebrachte Energie genau erfassen zu können. Im Gegensatz hierzu kann während eines Einfrierprozesses in den verschiedenen Abschnitten eines Einfrierprogramms die Art der Regelung (Vor- oder Rücklaufregelung) frei gewählt werden. Vorteil dieser Art von Regelung ist, dass die Kühlleistung auf geringe oder hohe Schrankbeladung angeglichen werden kann. Dies reduziert den Stickstoffverbrauch bei geringer Beladung und beschleunigt Einfrierprozesse bei hoher Schrankbeladung. Eine genaue Erklärung der Regelungssteuerung ist in Kapitel III.1 „Zusammenfassung der Operation Qualification“ zu finden. Das für die Versuche verwendete „Einfrierprogramm -75°C“ ist in Abbildung II-8 dargestellt.

Der Temperaturbereich der Temperieranlage ist infolge des Arbeitsbereichs des Umluftzirkulationslüfters auf einen Temperaturbereich von  $-150$  bis  $+80^{\circ}\text{C}$  beschränkt. Durch die im Zirkulationssystem integrierte elektrische Heizung kann eine sehr hohe Regelgenauigkeit eingehalten werden.

### Abbildung II-8

Graphische Darstellung des Sollwertverlaufs im „Einfrierprogramm  $-75^{\circ}\text{C}$ “ der KVS-Temperieranlage



## III. Ergebnisse

### 1. Qualifizierung der KVS-Temperieranlage

#### 1.1. Einführung

Aufgrund der weltweit gültigen GMP-Richtlinien ist es notwendig, Prozessanlagen für die Produktion von Wirkstoffen vor Inbetriebnahme einer eingehenden Funktionsprüfung (Qualifizierung) zu unterziehen. „*Qualifizieren ist der Beweis auf der Grundlage von Versuchen im Rahmen einer Validierung, dass ein Element des Herstellungsverfahrens die Eigenschaften besitzt, die zur Erzeugung einer bestimmten Qualität des Produktes erforderlich sind.*“ [32]. Für etablierte, d. h. bereits auf dem Markt frei vertriebene Produktionsanlagen existieren meist Prüfpläne, die von Hersteller- oder Lieferantenseite mitgeliefert werden. Da jedoch nicht jede Anlage baugleich ist und häufig nach individuellen Kundenwünschen gefertigt wird, muss ein Qualifizierungsplan je nach Einzelfall angepasst oder erweitert werden. Häufig finden hierbei auch Kritikpunkte seitens der Zulassungsbehörden Eingang. Somit sind Qualifizierungspläne einem fortlaufendem Wandel unterzogen. Nach auftretenden Mängeln während des Produktionsprozesses oder auch nach Reparaturen und Umbauten an der Anlage ist häufig eine Requalifizierung, also eine partielle oder vollständige Wiederholung der Funktionsprüfung notwendig. Nur eine uneingeschränkt qualifizierte Anlage darf für die Routineproduktion von Arzneimitteln verwendet werden.

Bei der KVS-Temperieranlage handelt es sich um eine völlige Neuentwicklung. Es war ein Konzept zu erarbeiten, um dieses System auf die Bedürfnisse der Produktion anzupassen. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle auch die Grundzüge der Qualifizierung und das genauere Funktionsprinzip vorgestellt.

Der erste Prototyp der Anlage wurde am endgültigen Standort beim pharmazeutischen Unternehmer installiert erstmals getestet. Eine Funktionstestung im Werk der KVS GmbH war nicht möglich, da dort insbesondere die technische Voraussetzung der Versorgung mit flüssigem Stickstoff nicht gegeben war.

Die Qualifizierung des Systems gliederte sich in drei Teile:

Während der **Installation Qualification (IQ)** wurde die korrekte Endmontage der Anlage überprüft. Alle wichtigen Anlagenteile sowie ein statistisch ermittelter Anteil der gesamten

Elektroverkabelung wurden hinsichtlich ihrer Konformität mit den Konstruktionsplänen kontrolliert.

Die **Operation Qualification (OQ)** soll die korrekte Funktionalität überprüfen. Kritische Parameter an der KVS Anlage waren hierbei insbesondere

- Funktionalität der Einzelteile
- Temperaturregelgenauigkeit
- Homogene Temperaturverteilung
- Leistungsdaten (maximale Prozessgeschwindigkeit)
- Verhalten bei auftretenden Störungen, d. h. nach Ausfall einzelner Anlagenteile

Der OQ-Plan enthielt über die oben genannten Tests hinaus noch einen detaillierten Versuchsplan, mit dessen Hilfe die verschiedenen Prozesszeiten für unterschiedliche Teilbeladungen der Anlage mit Produkt ermittelt werden sollten. Einen detaillierten Überblick hierzu gibt Kapitel III.1.2.

Der dritte Teil der Qualifizierung, die **Performance Qualification (PQ)**, wurde nach Abschluss der OQ erstellt. Die bis dato nur theoretisch erwogenen thermodynamischen und physikalischen Prozesse während des Einfrier- bzw. Auftauprozesses sollten im Laufe der OQ-Durchführung überprüft und durch praktische Erfahrungen ergänzt werden. Insbesondere sollten kurze Prozesszeiten, einfache Bedienbarkeit und somit geringe Gefahr von Bedienfehlern sowie produktschonende Prozessbedingungen gewährleistet werden.

Da für das weitere Verständnis des Performance-Qualification (PQ) die Kenntnis der Einfrier- und Auftaukinetik eine essentielle Voraussetzung ist, wird diese im folgenden Unterkapitel beschrieben. Da die Fa. Roche Diagnostics GmbH 4 nahezu baugleiche Anlagen besitzt und sämtliche Anlagen der identischen OQ unterzogen wurden, spiegeln die folgenden Ergebnisse eine Zusammenfassung aller bisherigen Qualifizierungen wider.

## 1.2. Zusammenfassung der Operation Qualification (OQ)

Um die Temperatur im Inneren der Behälter an verschiedenen Positionen im Produkt zu messen, wurden spezielle Stahlhülsen (Fühlermimik) als Einbauten in die Edelstahlbehälter konstruiert. Diese erlaubten es, die Temperatur sowohl nahe des Behältermantel als auch im Inneren des sich beim Einfrieren ausbildenden Eiszyinders zu messen. Die OQ-Testläufe forderten eine Überprüfung der Leistungsdaten der Anlage für das Einfrieren und Auftauen bei maximaler Schrankbeladung mit Pufferlösung. Zieltemperatur in den gefüllten Behältern waren  $-75^{\circ}\text{C}$  (Einfrierprozess) bzw.  $5^{\circ}\text{C}$  (Auftauprozess). Allerdings

war zunächst kein bestimmtes Temperaturprofil vorgeschrieben. Die aufwändige Steuerungstechnik der Anlage erlaubte es, nicht wie bei einem einfachen Gefrierschrank nur eine Solltemperatur einzustellen, sondern definierte Zeit/Temperaturprofile in der Produktkammer herzustellen. Die Anlage ist mit zwei Temperaturfühlern, einem Vor- und Rücklauffühler, ausgestattet. Der Vorlauffühler ist in dem Teil des Kühlmittleitungssystems angebracht, der den Stickstoff vom Zirkulationslüfter in die Produktkammer führt. Der Rücklauffühler ist hingegen kurz nach der Ansaugöffnung, dort wo der Stickstoff aus der Produktkammer über die Heizung und den Umluftmotor zurückgeführt wird, installiert (siehe auch Abbildung II-7). Während eines Einfrierprozesses kann in jedem Rezeptschritt die Art der Regelung (Vor- oder Rücklauf) festgelegt werden. Zu Beginn des Einfrierprozesses regelt die Anlage nach dem Rücklauffühler. Dies hat zur Folge, dass die Temperatur im Vorlauffühler zu Beginn eines Einfrierprozesses stark überschwingt, um den gewünschten Sollwert am Rücklauffühler zu erreichen. Das gesamte Volumen der Produktkammer muss erst auf den Sollwert abgekühlt werden, bis am Rücklauffühler der Sollwert erreicht wird. In Abhängigkeit der Ausgangstemperatur der Temperieranlage und der darin enthaltenen Container und der Steilheit des gewählten Temperaturprofils kommt es zu einem mehr oder weniger starkem Überschwingen der Vorlauftemperatur. Theoretisch wären Temperaturen von bis zu  $-196^{\circ}\text{C}$  (Siedepunkt von  $\text{LN}_2$ ) möglich. Die Bauart des Zirkulationslüfters der diesen Temperaturen ausgesetzt wird, erlaubt jedoch nur eine minimale Temperatur von  $-150^{\circ}\text{C}$ . Dies muss bei der Wahl des Einfrierprofils (auch Rezept genannt) berücksichtigt werden. Würde die Vorlauftemperatur zu eng begrenzt, könnte die Solltemperatur während des Einfrierprozesses am Rücklauffühler nicht mehr erreicht werden. Nachdem das gesamte Produkt eingefroren ist, wird von Rücklauf- auf Vorlauftemperaturregelung umgestellt, da für die Abkühlung des gefrorenen Produktes eine wesentlich geringere Kühlleistung ausreicht. Der Vorteil dieser Regelung besteht darin, dass die Einfriergeschwindigkeit von kleineren und größeren Mengen Produkt angeglichen werden kann. Eine vollständige Kompensation, also eine identische Einfriergeschwindigkeit bei unterschiedlicher Schrankbeladung kann jedoch nicht erreicht werden.

Da in den OQ-Plänen keine Aussagen über die zu verwendenden Rezepte gemacht werden, wurden für die Leistungsläufe Temperaturprofile gewählt, welche die maximalen Betriebstemperaturen weitgehend ausschöpften. Mit diesen Testläufen war es möglich Fehler oder fehlerhafte Einstellungen von Einzelkomponenten zu erkennen. So hätte eine zu geringen Rotationsgeschwindigkeit der Behälter oder eine zu geringe Drehzahl des

Umluftmotors zu einem verschlechterten Wärmeübergang zwischen dem Überträgermedium Stickstoff und der Edelstahlwand geführt und somit zu einer verlängerten Prozesszeit. Der Leistungslauf „Auftauen“ bei voller Schrankbeladung wurde bei der höchstmöglichen Vorlauftemperatur (+80°C) durchgeführt.

Darüber hinaus waren im OQ-Plan weitere Einfrier- und Auftauläufe bei verschiedenen Schrankbeladungen vorgeschrieben. Zieltemperaturen waren wie zuvor bei den Leistungsläufen  $-75^{\circ}\text{C}$  (Einfrieren) und  $+5^{\circ}\text{C}$  (Auftauen). Einen Überblick gibt **Tabelle III-1**. Durch die so erhaltenen Zeitwerte für das Auftauen und Einfrieren verschiedenen Mengen an Lösungen stellen die Basis für die Erstellung der späteren Produktrezepte dar.

**Tabelle III-1**

*Übersicht Einfrier- und Auftauläufe der Operation-Qualification*

Prozessbezeichnung	Zieltemperatur	Schrankbeladung
<b>Leistungslauf Einfrieren</b>	$-75^{\circ}\text{C}$	8 Behälter mit je 15L Puffer
<b>Leistungslauf Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	8 Behälter mit je 15L Puffer
<b>Einfrieren</b>	$-75^{\circ}\text{C}$	1 Behälter mit 15 L Puffer
<b>Einfrieren</b>	$-75^{\circ}\text{C}$	8 Behälter mit je 15 L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	1 Behälter mit 4L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	4 Behälter mit je 4L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	8 Behälter mit je 4L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	1 Behälter mit 15L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	4 Behälter mit je 15L Puffer
<b>Auftauen</b>	$+5^{\circ}\text{C}$	8 Behälter mit je 15L Puffer

#### 1.2.1. Einfrierläufe

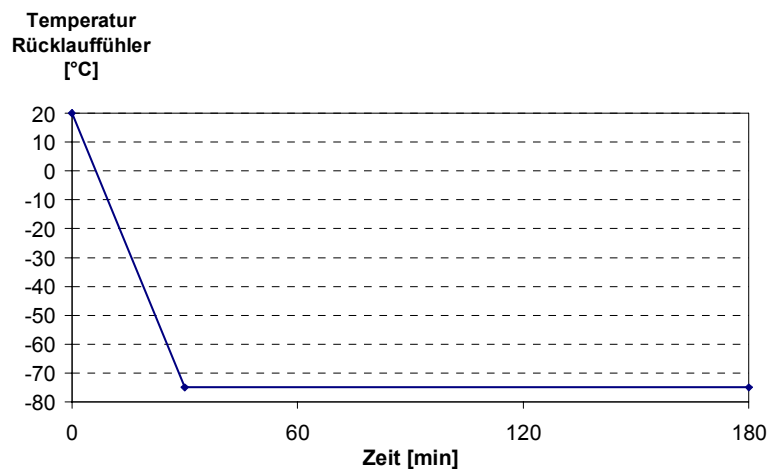
Für den Einfrierprozess wurde ein einfaches Temperaturprofil gewählt: Die Solltemperatur am Rücklauffühler wurde innerhalb von 30 Minuten linear auf den Zielwert (Rücklaufregelung) reduziert (Abbildung III-1) und anschließend bis zum Erreichen des Zielwertes in den Edelstahlbehältern gewartet. Eine Rezeptoptimierung in dieser Phase wurde nicht vorgenommen. Die Versuche sollten lediglich die homogene Temperaturverteilung zwischen den verschiedenen Behälterpositionen dokumentieren. Dies war aufgrund der gleichzeitigen Messung der Temperatur in den verschiedenen Behältern mit Hilfe der Fühlerhülsen möglich. Der Zeitraum bis zum Erreichen der geforderten Sollwerttemperatur lag bei Maximalbeladung bei ca. 6h. Grund für die recht



lange Prozesszeit ist nicht die fehlende Kühlleistung, sondern das gegen Ende des Einfrierprozesses anliegende geringe  $\Delta T$  zwischen Kühlmedium und Produkt. Der in die Lagerschrankkammer eingespeiste Stickstoff hat mit  $-75^{\circ}\text{C}$  kurz vor Erreichen des geforderten Sollwertes von  $-70^{\circ}\text{C}$  bestenfalls ein  $\Delta T$  von  $5^{\circ}$ . Die durch verschiedene Wärmequellen eingebrachte Energie – in diesem Zusammenhang sei auf den Energieeintrag durch die Kammerwand sowie durch die Türdichtungsheizungen hingewiesen – bewirken eine nochmalige Erhöhung der Kammertemperatur auf ca.  $-73^{\circ}\text{C}$  bis  $-72^{\circ}\text{C}$ . Das Produkt kühlt also schnell auf bis zu  $-60^{\circ}\text{C}$  ab, mit abnehmender Produkttemperatur reduziert sich dann aber die Abkühlrate, da  $\Delta T$  zwischen Edelstahlbehälter und Kühlmedium immer kleiner wird und sich asymptotisch an die Endtemperatur annähert. Eine Optimierung des Einfriervorgangs fand während der PQ statt.

### Abbildung III-1

*Temperaturverlauf des Rücklauffühlers*



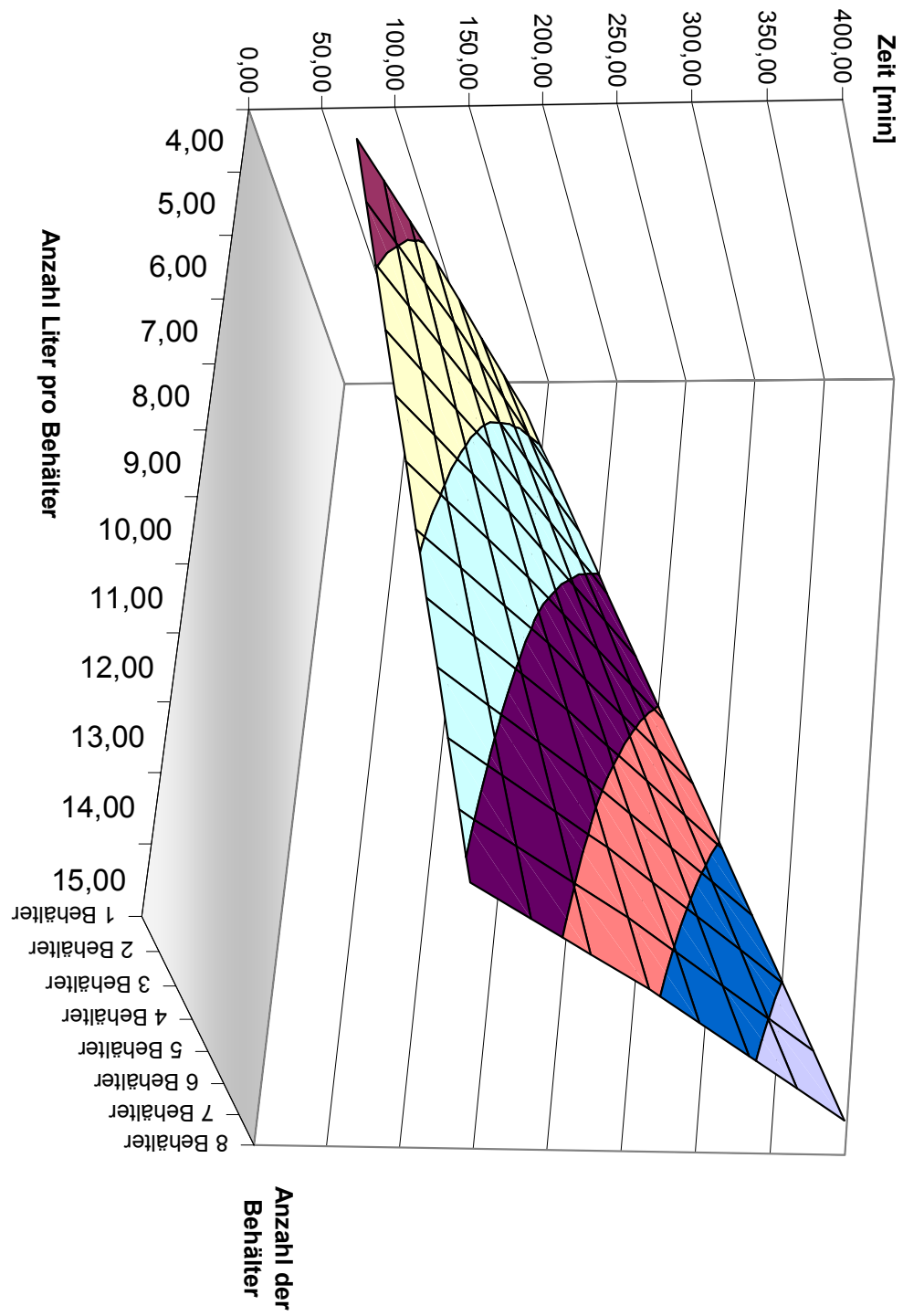
#### 1.2.2. Auftauläufe

Zeigte sich bei den Einfrierversuchen, dass Optimierungsbedarf bestand, erwies sich ein identischer Lösungsansatz für die Auftauläufe als nicht praktikabel. Die Auftaugeschwindigkeit ist – wie auch beim Einfrieren – linear abhängig vom Temperaturunterschied zwischen Überträgermedium und Produktbehälter. Während des Auftauvorgangs arbeitet die Anlage ausschließlich in Vorlaufregelung. Dadurch kann die Menge der in das System eingebrachten Energie genau kontrolliert und dosiert werden, um eine übermäßige Produkterwärmung zu vermeiden. Während beim „Leistungslauf Einfrieren“ dank der zu Beginn aktivierten Rücklaufregelung eine minimale

Vorlauftemperatur von bis zu  $-150^{\circ}\text{C}$  erreicht wird, und dadurch eine Prozessgeschwindigkeit von 2h für das Temperieren einer Vollbeladung auf  $-75^{\circ}\text{C}$  möglich ist, sind die Prozessgeschwindigkeiten für das Auftauen einer identischen Schrankbeladung bei konstant  $+5^{\circ}\text{C}$  äußerst gering. Prozesszeiten von bis zu 50h waren die Folge. Die einzige Möglichkeit die Prozesszeit zu verringern war die Erhöhung der Vorlauftemperatur. Da die zu temperierenden Proteine, insbesondere Interferon keinen Temperaturen größer als  $5^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt werden durften, war es notwendig diese erhöhte Temperatur nur für einen begrenzten Zeitraum in der Produktkammer auf die Behälter einwirken zu lassen. Hierbei durfte das Produkt selbst nie diese  $5^{\circ}\text{C}$  überschreiten. Aus diesem Grund wurde festgelegt, dass diese OQ-Läufe mit einer Vorlauftemperatur von  $+35^{\circ}\text{C}$  durchgeführt werden sollten. Ziel war es, den Zeitraum zu bestimmen, der notwendig war, um eine definierte Kammerbeladung mit konstant  $35^{\circ}\text{C}$  bis auf eine Temperatur von  $+5^{\circ}\text{C}$  zu erwärmen. Diese Zeitwerte in Abhängigkeit der Schrankbefüllung sind in Abbildung III-2 dargestellt. Dieser Zusammenhang wird im weiteren Verlauf als Auftaukinetik der Anlage bezeichnet. Durch die Versuchreihe war es außerdem möglich, die gleichmäßige Temperaturverteilung in den einzelnen Behälterpositionen zu überprüfen. Alle Anlagen zeigten sehr konstante Temperaturverteilungen.

Abbildung III-2

*Dreidimensionale Darstellung der Aufbauphase von -65°C bis +5°C Produktemperatur in der KVS-Temperieranlage*



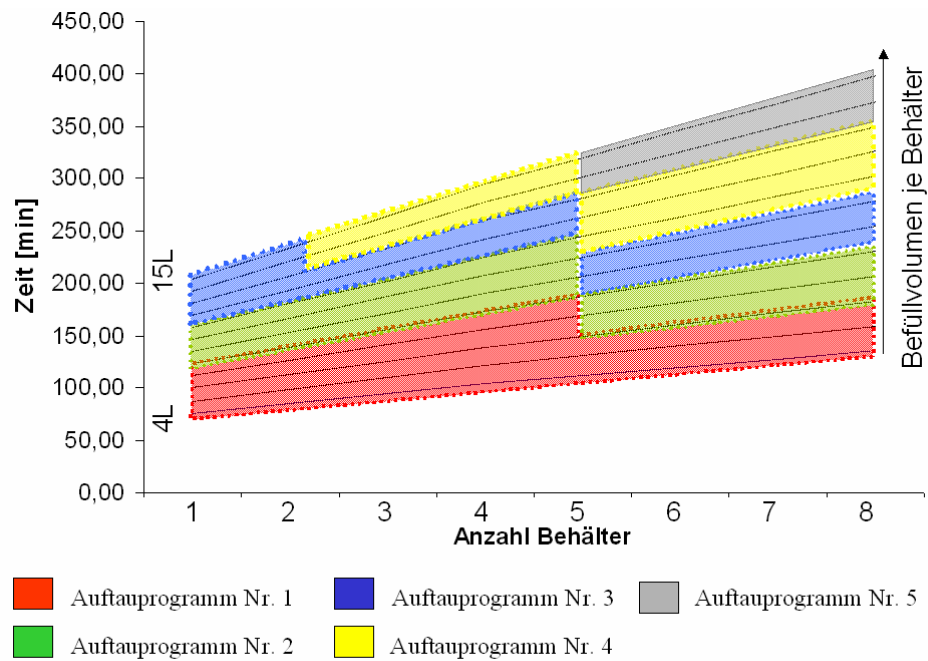
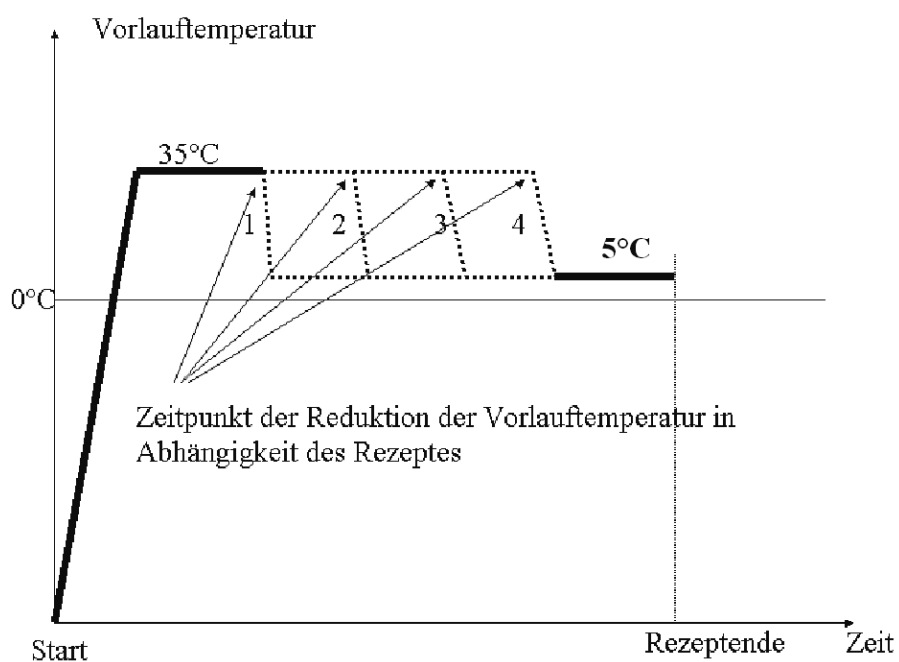
Für später qualifizierte Anlagen wurde als zusätzliches Testkriterium eine maximale Abweichung der Prozesszeit zwischen den Behälterinhalte in den verschiedenen Positionen während des Auftaulaufes definiert. Bei der Wiederholung identischer Auftauläufe zeigte sich, dass die Zeitwerte mit einer relativen Standardabweichung von  $< 2,5\%$  von der Gesamtprozesszeit ( $n=4$ ) eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufwiesen.

An dieser Stelle soll nochmals die Problematik bei der Erstellung von zeitlich optimierten Auftauprofilen verdeutlicht werden. Grundsätzlich wäre es möglich alle Schrankbeladungen von 1 Behälter mit 4L bis hin zu 8 Behältern mit je 15L mit einem Auftaurezept aufzutauen. Allerdings – unter Vermeidung von Temperaturen größer  $5^{\circ}\text{C}$  – ergeben sich daraus Prozesszeiten von bis zu 50 Stunden. Unter regulatorischen Gesichtspunkten müssten alle Schrankbeladungen über einen Zeitraum von 50 Stunden hinweg im Schrank aufgetaut werden: Eine vorzeitige Entnahme hätte zur Folge, dass für jede Schrankbeladung die Mindestprozesszeit errechnet werden müsste. Nur so kann vermieden werden, dass sich noch Reste an gefrorener Lösung in den Behältern befinden.

Bedienungsfehler scheinen vorprogrammiert, und auch die Tatsache, dass ein Prozess, der – im Falle einer sehr geringen Produktmenge – in wenigen Stunden abgeschlossen wäre, künstlich auf 50 Stunden ausgedehnt wird, ist nicht akzeptabel. Aus diesem Grund entschied man sich zu einem anderen Lösungsansatz: Man teilt die verschiedenen Schrankbeladungen in unterschiedliche, sich in der Prozesszeit überlappende Zonen. Jede dieser Zonen ist einem speziellen Auftauprogramm zugeordnet (**Abbildung III-3**).

Je mehr Zonen man wählt, desto genauer kann dieses Auftauprogramm für die jeweilige Beladung zeitlich optimiert werden. Um jedoch die Gefahr durch Bedienfehler gering zu halten, muss ein Kompromiss zwischen Anzahl der Zonen und Prozesszeiten gefunden werden. Es wurden fünf verschiedene Bereiche und damit auch fünf unterschiedliche Auftaurezepte zugelassen. Eine Prozesszeitreduktion um den Faktor 2,5 war die Folge.

Es zeichnete sich ein einheitliches Konstruktionsprinzip für die Auftaurezepte ab: Man taut bei  $+35^{\circ}\text{C}$  (Abbildung III-4) auf, solange noch Eisreste vorhanden sind. Dadurch ist gewährleistet, dass die Produkttemperatur  $< +5^{\circ}\text{C}$  bleibt. Noch bevor das gesamte Eis geschmolzen ist, wird die Vorlauftemperatur auf  $+5^{\circ}\text{C}$  zurückgeschaltet, um eine Produkterwärmung  $> +5^{\circ}\text{C}$  zu vermeiden. Dieser Vorgang kostet Zeit, ist jedoch sicher.

**Abbildung III-3***Einteilung der Auftaurezepte in Abhängigkeit der Schrankbeladung***Abbildung III-4***Regelung der Vorlauftemperatur in Abhängigkeit der Schrankbeladung*

Durch die Reduktion der Vorlauftemperatur von 35 auf 5°C wird das  $\Delta T$  zwischen Produkt und Überträgermedium auf 1/7 verringert, wodurch sich die Prozesszeit im Vergleich zu 35°C versiebenfacht. Unter Berücksichtigung der aus dem OQ-Läufen bekannten Gesamtprozesszeit für das Auftauen der maximalen Schrankbeladung von 7h bei +35°C Vorlauftemperatur wird deutlich, dass durch die frühzeitige Reduktion der Vorlauftemperatur Auftauzeiten von bis zu 20h erreicht werden können.

Eine wichtige Prämisse ist die annähernde Gleichbefüllung aller Behälter. Es ist also nicht möglich einen mit 4L und mit 15L befüllten Behälter gleichzeitig aufzutauen.

Aus den Qualifizierungen von vier verschiedenen Anlagen wurde deutlich, dass trotz gleicher Bauweise, Unterschiede zwischen den Auftaugeschwindigkeiten in den Anlagen existieren. So wurden also während der OQ von jeder Anlage die Daten zu Ermittlung der Auftaukinetik erhoben. Die qualifizierten Anlagen unterschieden sich in der jeweiligen Abluftführung. Zwei Systeme waren an ein vergleichbares Abluftsystem angeschlossen und wiesen auch nahezu identische Prozesszeiten auf. Die anderen Anlagen wichen um bis zu 10% in der Gesamtprozesszeit von einander ab. Obwohl diese Differenz nicht sehr groß erscheint, so hatte dies in der Praxis Auswirkungen auf die zu verwendenden Produktrezepte.

Die Abstimmung der Rezepte auf das jeweilige System erfolgte durch Adaption der Dauer der einzelnen Rezeptschritte.

#### *1.2.3. Erstellung der Auftaurezepte*

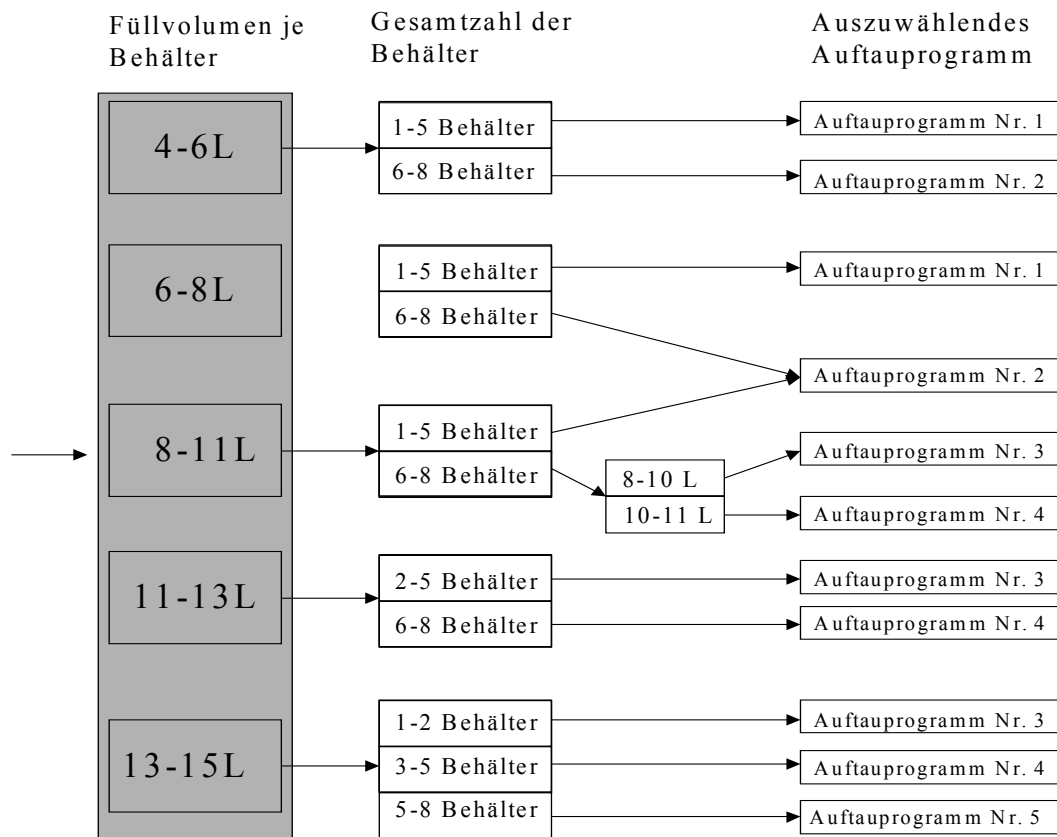
Aus der Abbildung III-1 können die genauen Prozesszeiten für das Auftauen einer bestimmten Produktmenge bei konstant +35°C abgelesen werden. Um maximale Flexibilität zu gewährleisten werden annähernd gleiche Segmente gebildet. Daraus resultieren ähnliche Prozesszeiten. Die Anzahl der Rezepte bestimmt die Gesamtdauer reziprok, d.h. je mehr Rezepte zur Verfügung stehen, umso genauer kann das Rezept für die jeweilige Schrankbeladung optimiert werden. Da jedoch eine einzige Minimal- oder Maximalbefüllung nicht ausreicht um alle erdenklichen Schrankbeladungen abzudecken, sind Mehrfachzuordnungen notwendig.

Das Problem wurde durch die Verwendung von maximal 3 zulässigen Minimal- bzw. Maximalbeladungen gelöst. Um alle theoretisch möglichen Schrankbeladungen zu erfassen, war eine ausreichende Überlappung der Prozesszeiten notwendig, wodurch sich die Rezepte verlängerten. Die Auswahl des richtigen Rezeptes kann durch Verwendung eines einfachen Fließschemas (Abbildung III-5) dem Bediener erleichtert werden. Sollten häufig identische Volumina aufgetaut werden, ist die Erstellung eines genau auf diese Beladung abgestimmten Rezeptes möglich. Die Prozesszeit kann somit problemlos auf unter 7h verringert werden. Bei

Produkten, die höheren Temperaturen ausgesetzt werden können, kann die Temperatur des letzten Schrittes zu erhöht werden.

### Abbildung III-5

*Fließschema zur Ermittlung des richtigen Auftauprogramms in Abhängigkeit der Schrankbeladung*



Hierdurch können drastische Zeiteinsparungen erzielt werden. Eine Erhöhung der Temperatur im letzten Auftauschritt auf +15°C führt beispielsweise zu einer Verringerung der Prozesszeit dieses Rezeptschrittes um bis zu 2/3. Dieser Lösungsansatz wurde für das Auftauen von weniger temperatursensitiven Proteinen umgesetzt. Dadurch konnte unter Beibehaltung des zuvor genannten Rezeptdesigns eine maximale Prozesszeit von 10h für alle Schrankbeladungen erreicht werden.

### 1.3. Performance Qualification des Temperierschranks

Während die OQ die korrekte Funktionen und Leistungsdaten überprüft, so ist die PQ anwendungsbezogen: Produktionsnahe bzw. produktionsidentische Prozessschritte werden simuliert und überprüft. Häufig finden so genannte „worst case“-Simulationen Anwendung um die Anzahl der Versuche zu reduzieren. Nach verbindlicher Aussage der FDA ist damit gemeint, dass ein Herstellungsverfahren an den Toleranzgrenzen der Spezifikationen noch ein Endprodukt innerhalb der Spezifikationsgrenzen ergeben muss [46]. Im Falle der KVS-Anlage wurde die vielfach bei der Qualifizierung von Prozessanlagen in die PQ integrierte Ermittlung der Produktstabilität aus der PQ herausgenommen und gesondert im Rahmen von Validierungen untersucht. Die PQ beschränkt sich somit auf die Überprüfung der zuvor festgelegten Produktrezepte hinsichtlich einer möglichen Produktüberhitzung bzw. Erreichen der geforderten Einfriertemperatur. Grund hierfür war der enorm hohe Produktbedarf der für die Durchführung aller Versuche der PQ notwendig gewesen wäre.

#### 1.3.1. *Der Einfrierprozess auf $-75^{\circ}\text{C}$*

Aufgrund der unter Kapitel III.1.2 beschriebenen Umschaltung der Rücklauf- auf Vorlaufregelung der Anlage konnte durch die Erfahrungen aus der OQ und durch weitere Testläufe ein Temperaturprofil gefunden werden, mit dem es möglich ist, alle zulässigen Schrankbeladungen innerhalb von 3h auf eine Endtemperatur von  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$  einzufrieren.

Das Einfrierrezept bestand aus mehreren Teilen: Im ersten wurde die Kammertemperatur innerhalb von 30 Minuten auf  $-85^{\circ}\text{C}$ , also  $10^{\circ}\text{C}$  unterhalb der eigentlichen Zieltemperatur ( $-75^{\circ}\text{C}$ ), reduziert. Der zweite Schritt sah eine Beibehaltung dieses Wertes über einen Zeitraum von 60 Minuten vor. In Verbindung mit der, während dieser Prozessschritte aktiven, Rücklaufregelung wurde ein stärkeres Überschwingen der Vorlauftemperatur auf bis zu  $-150^{\circ}\text{C}$  und damit eine Beschleunigung des Einfrierprozesses bewirkt. Anschließend wurde die Kammertemperatur innerhalb von 15 Minuten auf  $-75^{\circ}\text{C}$  erhöht und gleichzeitig von Rück- auf Vorlaufregelung umgeschaltet. Diese Temperatur wurde über zwei Stunden bei  $-75^{\circ}\text{C}$  gehalten, wodurch eine Angleichung der Produkttemperaturen bei unterschiedlicher Schrankbeladung erreicht werden konnte. Während eine Maximalbeladung erst innerhalb dieser Phase auf den Zielwert von  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$  abgekühlt wurde, erwärmte sich ein minimal befüllter Behälter auf diesen Wert hin, da dieser in der Zwischenzeit Temperaturen bis zu  $-85^{\circ}\text{C}$  erreicht hatte. Eine vorübergehende „Unterkühlung“ des Produkts auf Temperaturen von bis zu  $-85^{\circ}\text{C}$  wurde als unkritisch eingestuft. Auch in der Literatur konnte kein



Anhaltspunkt für eine Veränderung von Proteinen durch eine Reduktion der Lagertemperatur unterhalb von  $-60^{\circ}\text{C}$  gefunden werden. Die Gefahr einer Kältedenaturierung ist durch die bei derart tiefen Temperaturen sehr eingeschränkte Kinetik der Moleküle weitgehend unwahrscheinlich: Die eutektischen Punkte sowie die Glasübergangstemperaturen von den häufig in pharmazeutischen Produkten verwendeten Lösungsbestandteilen sind bei Weitem unterschritten.

Anhand von zwei Testläufen sollte überprüft werden, ob bei allen möglichen Schrankbeladungen die geforderte Produkttemperatur erreicht wurde. Es handelte sich hierbei jeweils um worst case Simulationen: Minimal und maximal zulässige Schrankbeladung, also 1 Behälter mit 4L Pufferlösung sowie 8 Behälter mit je 15L Puffer. Um möglichst produktionsnahe Bedingungen zu generieren wurde der später verwendete Produktpuffer verwendet. Allerdings zeigten vergleichende Messung in mit Wasser befüllten Behältern keinen signifikanten Unterschied in den Einfrier- und Auftauprofilen. Lediglich der Gefrier- bzw. Schmelzpunkt der Lösung war je nach Pufferlösung um  $1\text{-}2^{\circ}\text{C}$  verschoben.

#### 1.3.2. *Der Auftauprozess*

Während beim Einfrierprozess eine Unterkühlung des Produktes unkritisch zu beurteilen ist, kann eine zu starke Erwärmung bei hitzeempfindlichen Proteinen zu Produktverlust führen. Um jedoch das Protein während des Auftauprozesses möglichst kurz einem hohen Stressrisiko auszusetzen sollte ein zügiges Auftauen bewirkt werden. Wie in Kapitel III.2.1 ausgeführt, kommt es durch den Einfrierprozess zu Cryokonzentrationseffekten innerhalb des Eiszylinders. Diese höher konzentrierte Lösung wird bereits bei tieferen Temperaturen, also schon zu Beginn des Auftauprozesses wieder im flüssigen Aggregatzustand vorliegen. Je schneller also die niedriger konzentrierte Lösung auftaut und somit zu einem Verdünnungseffekt führt, umso kürzer liegt das Protein in einer hochkonzentrierten Lösung vor. Aus Gründen der Rationalisierung ist eine Reduktion der Prozesszeit gewünscht.

Im Rahmen der PQ wurden die zuvor aus den Daten der OQ erstellten Auftaurezepte hinsichtlich einer Produktüberhitzung bei rezeptspezifischer Minimalbeladung überprüft (worst case Simulation).

Bei der Durchführung der PQ an drei verschiedenen Prozessanlagen zeigte sich, dass nur bei zwei PQ-Rezepten nachträgliche Änderungen in Form einer geringfügigen Prozesszeitverkürzung bei  $+35^{\circ}\text{C}$  durchgeführt werden mussten (Tabelle III-2).

Auch die Überprüfung der maximal zulässigen Schrankbeladung hinsichtlich eines vollständigen Auftauprozesses während der Prozesszeit wurde an einer Anlage überprüft.

Die Überprüfung der Produktstabilität während wiederholter Einfrier-Auftauzyklen in der KVS-Anlage wurde in gesonderten Stabilitätsvalidierungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kapitel III.3 bis III.6 vorgestellt.

#### 1.4. Zusammenfassung

Die Qualifizierung der KVS-Temperieranlagen konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Sämtlich während der Qualifizierungstätigkeiten aufgetretenen Mängel wurde beseitigt, und die Anlage ist in der beschriebenen Form voll funktionsfähig.

Im Rahmen der Qualifizierung konnte gezeigt werden, dass die Anlage in der Lage ist, Lösungen in einem Volumenbereich von 4 L bis 120 L innerhalb von nur 3 Stunden einzufrieren. Ebenso ist das Auftauen des gleichen Volumenbereichs innerhalb von 7 Stunden möglich. Temperatursensitive Lösungen können mit nur geringfügig unterschiedlichen Programmen in Abhängigkeit der maximal zulässigen Produkttemperatur innerhalb von 12 bis 24 h aufgetaut werden. Darüber hinaus weist die Anlage eine äußerst präzise Regelgenauigkeit ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) auf.

Die technischen Kriterien zur Verwendung der KVS-Anlage als Einfriersystem von Proteinlösungen im Großmaßstab wurden also erfüllt. Jedoch musste anhand von Versuchen mit Proteinlösungen überprüft werden, ob das Prinzip des dynamischen Einfrierens und Auftauens eine hohe Proteinstabilität gewährleistet.

**Tabelle III-2***Ergebnisse der PQ-Durchführung von drei KVS-Temperieranlagen*

<i>PQ-Lauf Nr.</i>	<i>Schrankbeladung</i>	<i>Rezept</i>	<i>Ergebnis</i>	<i>Wiederholung</i>	<i>Ergebnis</i>
<b>KVS-Temperieranlage Nr. 1</b>					
1	Minimalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
2	Maximalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
3	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 1	erfolgreich	keine	
4	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 2	erfolgreich	keine	
5	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 3	erfolgreich	keine	
6	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 4	erfolgreich	keine	
7	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 5	erfolgreich	keine	
<b>KVS-Temperieranlage Nr. 2</b>					
1	Minimalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
2	Maximalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
3	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 1	erfolgreich	keine	
4	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 2	+5°C überschritten	verkürztes Rezept	erfolgreich
5	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 3	+5°C überschritten	verkürztes Rezept	erfolgreich
6	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 4	erfolgreich	keine	
7	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 5	erfolgreich	keine	
<b>KVS-Temperieranlage Nr. 3</b>					
1	Minimalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
2	Maximalbeladung	Standarteinfrierrezept -80°C	erfolgreich	keine	
3	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 1	erfolgreich	keine	
4	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 2	erfolgreich	keine	
5	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 3	erfolgreich	keine	
6	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 4	erfolgreich	keine	
7	rezeptspezifische Minimalbeladung	Auftaurezept Nr. 5	erfolgreich	keine	

## 2. Bestimmung und Quantifizierung von Cryokonzentrationseffekten

Häufig werden in der Literatur Konzentrationseffekte durch den Einfriervorgang als die Stabilität von Proteinen beeinflussender Faktor genannt. Jedoch finden sich nur sehr wenige Stellen, die Veränderungen oder Reduktion dieser Cryokonzentrationseffekte durch technische Eingriffe [24, 26, 51-53] oder durch die Verwendung von Hilfsstoffen bzw. geeignete Proteinformulierungen beschreiben.

Aus diesem Grund sollte versucht werden, die Cryokonzentration in der KVS-Temperieranlage und dem CryoWedge™, die auf ganz unterschiedlichen Technologien beruhen, quantitativ zu erfassen. Von Interesse waren die auftretenden Cryokonzentrationseffekte und deren mögliche Auswirkungen auf die Proteinstabilität.

Während der Untersuchungen zeigte sich schnell, dass das CryoWedge™ der Fa. Integrated Biosystems® sehr gut geeignet ist, um die Cryokonzentrationseffekte zu quantifizieren und vergleichende Versuche mit verschiedenen Lösungsbestandteilen durchzuführen.

### 2.1. Cryokonzentrationseffekte in der KVS-Temperieranlage

#### 2.1.1. *Probenahme und Versuchsdurchführung*

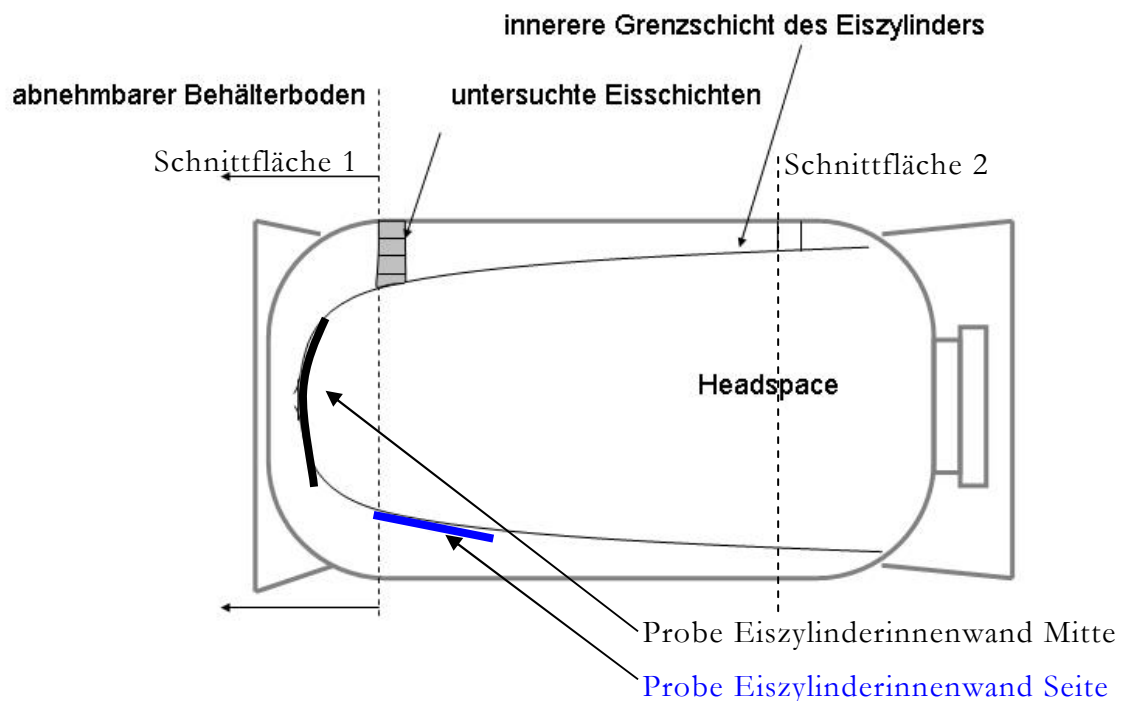
Die Bestimmung der Cryokonzentration in der KVS-Anlage war nur durch Probenahme aus dem gefrorenen Eisblock möglich. Eine Entnahme aus der noch nicht gefrorenen Produktlösung während des Einfrierprozesses war technisch undurchführbar. Der KVS-Temperierschrank stellt ein geschlossenes System dar. Ein Öffnen des Schrankes ist aus sicherheitstechnischen Gründen erst dann möglich, wenn der Gasraum des Schrankes wieder einen Sauerstoffgehalt von 17 % erreicht hat. Eine Verriegelungsautomatik verhindert ein vorzeitiges Öffnen. Durch den unumgänglichen Wartezeitraum von ca. 15 Minuten wäre eine massive Beeinflussung der Konzentrationseffekte zu erwarten gewesen. Der Einfrierprozess in der Anlage wäre bei abgeschaltetem Behältermotor in der kalten Anlage weiter fortgeschritten.

Nach einem Einfriervorgang in den Edelstahlbehältern der KVS-Temperieranlage bildet sich ein zylindrischer Eisblock aus (Abbildung III-6). Daher musste ein Weg gefunden werden, den gesamten Eisblock aus dem Behälter zu entfernen, um Proben erhalten zu können. Hierzu wurde ein Produktbehälter aus Edelstahl so präpariert, dass der gesamte

Behälterboden abgenommen und der Eiszylinder aus dem Edelstahlbehälter entnommen werden konnte. Anschließend wurde der Eisblock auf Höhe des Öffnungsflansches (Schnittfläche 1) und im oberen Behälterbereich (Schnittfläche 2) quer durchgeschnitten. Auf diese Weise war der Eisblock für die Probenahme zugänglich. Die Probenziehung selbst wurde mit Hilfe eines Hohlkernbohrers (Durchmesser 0.5 cm) durchgeführt. Die hierdurch gewonnenen Proben wurden hinsichtlich Proteinkonzentration ausgewertet.

### Abbildung III-6

*Schematische Darstellung des Behälterquerschnittes und des sich ausbildenden Eiszylinders*



Die Versuche wurden im Rahmen von Stabilitätsuntersuchungen von Interferon alfa-2a Bulklösung (1.38 mg/mL und 4.6 mg/mL) und Peginterferon alfa-2a Bulklösung (1.3 mg/mL) durchgeführt. Das Befüllvolumen betrug bei allen Versuchen 14.5 L.

### 2.1.2. *Ergebnisse*

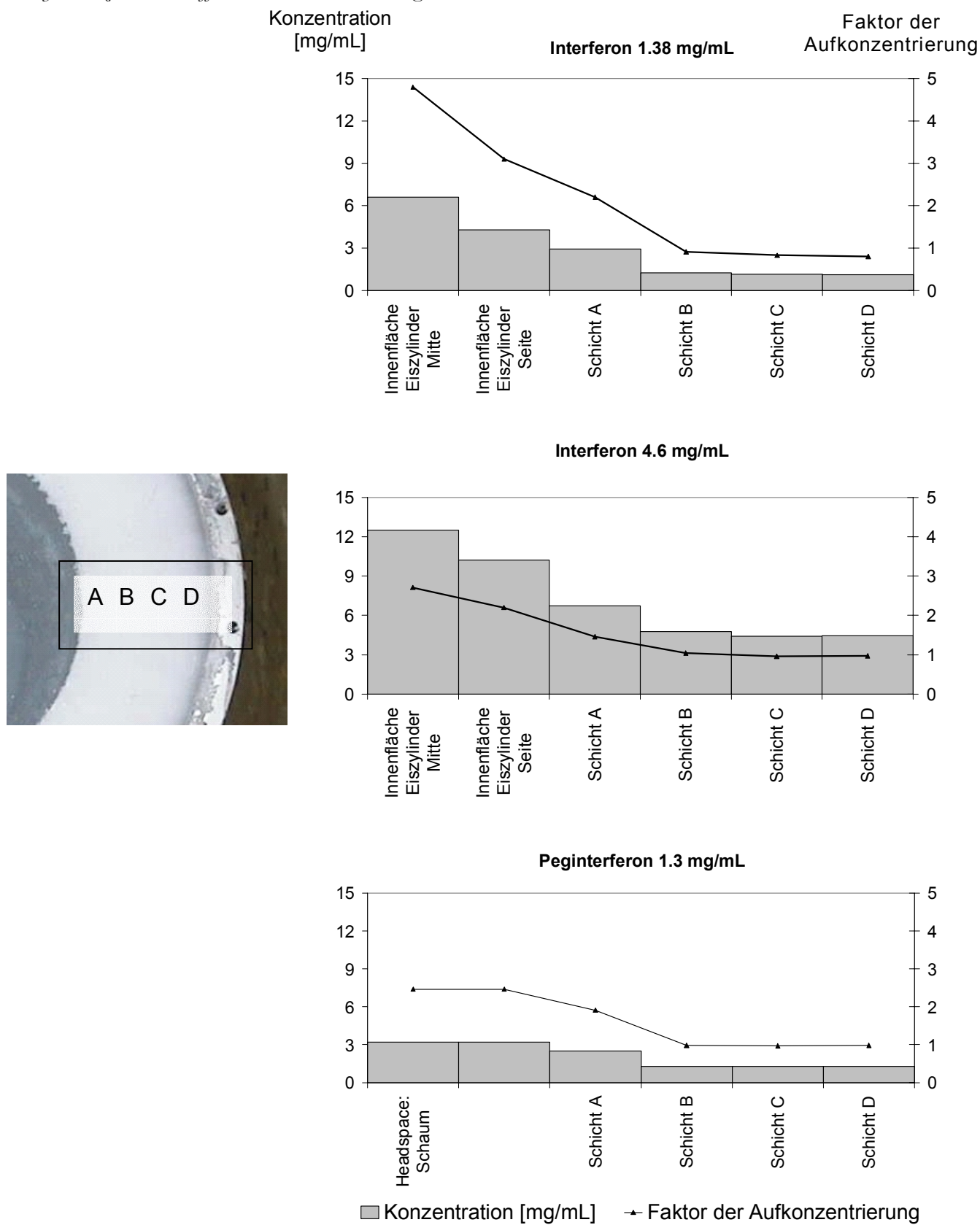
Die Ergebnisse aus Abbildung III-7 und Tabelle III-2 zeigen sehr deutlich, dass während des Einfrierprozesses in der KVS-Temperieranlage eine Aufkonzentrierung von Lösungsbestandteilen stattfindet. Interferon alfa-2a unterliegt bei gleicher Konzentration wie pegyliertes Interferon einer etwas stärkeren Cryokonzentration. Ein Grund hierfür könnte in der höheren Hydrophilie von pegyliertem Interferon liegen. Durch den Polyethylenrest wird das Protein deutlich hydrophiler, könnte somit also verstärkt Wechselwirkung mit den sich bildenden Eiskristallen eingehen und dadurch die Aufkonzentrierung des Proteins verringern. Darüber hinaus fällt auf, dass bei höherer Ausgangskonzentration von Interferon der Faktor der Cryokonzentration etwas abnimmt. Finden sich bei einer Ausgangskonzentration von 1.38 mg/mL Interferon am Behälterboden maximal 6.6 mg/mL Protein, also fast das Fünffache, so ist nach Erhöhung der Ausgangskonzentration auf 4.6 mg/mL nur mehr eine knappe Verdreifachung (12.5 mg/mL) feststellbar.

Bei der Untersuchung des gefrorenen Eiszylinders mit Peginterferon zeigte sich, dass der Headspace, also der Raum im Inneren des Zylinders, zum Teil mit gefrorenem Schaum gefüllt war. Zur Analyse dieses Schaums wurden verschiedene Proben genommen, die jedoch an allen Stellen nahezu identische Proteinkonzentrationen aufwiesen. Dieser gefrorene Schaum wurde im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen eingehend analysiert. Die Ergebnisse sind im Kapitel III-4 zu finden.

Die durchgeführten Untersuchungen benötigten zum einen sehr große Mengen an Protein und zum anderen ist auch die Probenahme äußerst aufwändig. Außerdem ist eine wirkliche Quantifizierung der Cryokonzentrationseffekte schwer möglich. Neben den hier aufgeführten Proben wurden bei sämtlichen Versuchen weitere 20 Proben aus dem Eiszylinder entnommen. Diese bestätigten den Trend der vorgestellten Ergebnisse. Trotzdem ist die Probennahme nur eine stichprobenartige Untersuchung. Für eine systematische Untersuchung zur Quantifizierung von Cryokonzentrationseffekten erschien dieses System aus den oben genannten Gründen, der schwierigen und unsicheren Probenahme und der riesigen Proteinmenge als ungeeignet.

Es bleibt festzuhalten, dass mit der Rotationsbewegung während des Einfrierprozesses eine deutliche Cryokonzentration stattfindet.

## Abbildung III-7

*Cryokonzentrationseffekte in der KVS-Anlage*

**Tabelle III-3**

Ergebnisse der Konzentrationsverteilung im Eiszylinder nach einem Einfrierprozess in der KVS-Anlage

Ort der Probenahme		Interferon alfa-2a				Pegyliertes Interferon alfa-2a	
		Ausgangskonzentration 1.38 mg/mL		Ausgangskonzentration 4.6 mg/mL		Ausgangskonzentration 1.3 mg/mL	
Querschnitt 1	Schicht A	Proteinkonz. absolut [mg/mL]	Proteinkonz. [%]vom Ausgangswert	Proteinkonz. absolut [mg/mL]	Proteinkonz. [%]vom Ausgangswert	Proteinkonz. absolut [mg/mL]	Proteinkonz. [%]vom Ausgangswert
	Schicht B	2.92	220	6.72	146	2.49	191
	Schicht C	1.25	91	4.78	104	1.28	98
	Schicht D	1.14	83	4.42	96	1.26	98
Querschnitt 2	Schicht C	1.11	80	4.46	97	1.28	98
	Schicht C	1.18	85	4.66	101	1.32	102
	Schicht B	1.21	88	4.52	98	1.28	98
	Schicht A	1.81.	131	4.50	98	1.30	100
Behälterinnenwand (geschabt)		4.3	310	10.2	222		
Behälterboden (geschabt)		6.6	480	12.5	271	3.20*)	246*)

\*) Der Headspace war mit gefrorenem Schaum gefüllt



## 2.2. Cryokonzentrationseffekte im 20-Zoll CryoWedge™ von Integrated Biosystems®

### 2.2.1. Einleitung und Vorversuche

Die Firma Integrated Biosystems® bewirbt das von ihr vertriebene CryoFin™-Konzept mit dem Hauptargument, dass durch den kontrollierten Einfrierprozess eine Produktentmischung während des Einfrierprozesses weitgehend vermieden werden könne.

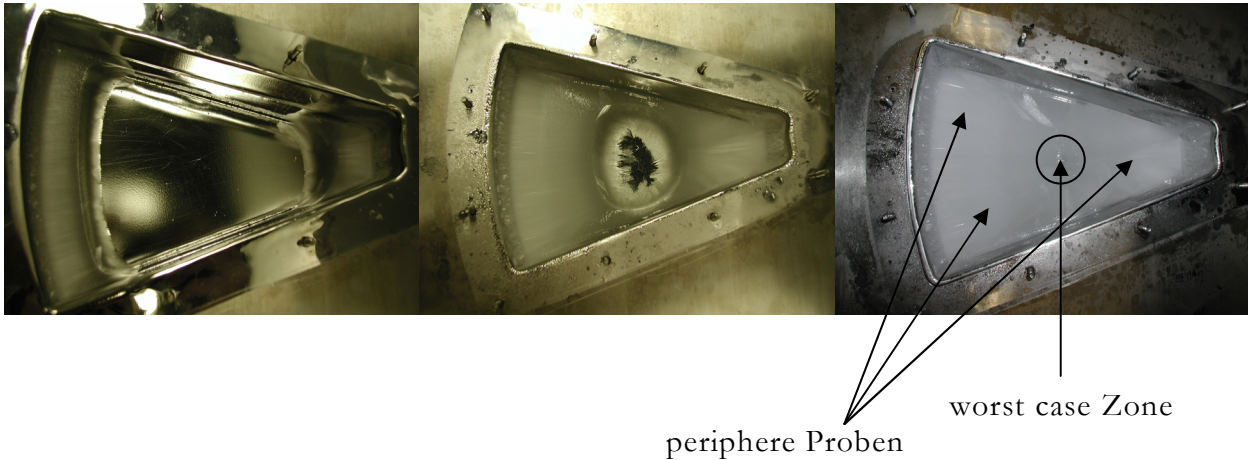
Die Versuche wurden in einem 20-Zoll großen CryoWedge™ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Produktkammer aus Edelstahl, die eine tortenstückartige Grundfläche besitzt. Die Produktkammer ist von oben gut zugänglich, da als Abdeckung eine Plexiglasplatte dient. Während des Einfrierprozesses kann die Eisbildung genau beobachtet und untersucht werden (**Abbildung III-8 a-c**). Durch den gekühlten Edelstahlmantel kommt es zu einer kontrollierten Eisbildung vom Edelstahlmantel in die Produktlösung hinein. Gegen Ende des Prozesses gefriert die Lösung in der Mitte der Produktkammer. Diese Zone ist nach Abschluss der Eisbildung durch eine deutliche Erhöhung infolge der Kristallisationsprozesse erkennbar.

Die ersten Versuche zur Ermittlung der Aufkonzentrierung wurden durch Probenahme mittels einer Hamilton®-Spritze kurz vor der Eisbildungsfront durchgeführt. Hierbei konnten nahezu keine Konzentrationsunterschiede festgestellt werden. Erst gegen Ende des Kristallisationsprozesses zeigte sich ein Anstieg der Elektrolyt- und Proteinkonzentration. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch diese Art der Probenahme nach Wiederholung des identischen Versuchs, große Unterschiede der gemessenen Konzentration auftraten. Der Grund lag in einem nicht standardisierbaren Restvolumen noch flüssigen Produktes. Die Eisbildung findet zu diesem Zeitpunkt in Form langer Nadeln durch die zu untersuchenden Zone hindurch in mehreren Schichten statt. Das heißt, dass die Eisbildung dreidimensional inhomogen verläuft. Auch der Versuch, die Probenahme zeitlich zu standardisieren schlug fehl, da die Abweichungen in der Eisbildungsgeschwindigkeit infolge äußerer Temperatureinflüsse zu groß waren. Bei dem gesamten Einfrierprozess von 6 bis 7 Stunden ist der für diese Art der Probenahme interessante Teil auf nur wenige Minuten begrenzt.

Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, die Proben – ähnliche wie bei den Untersuchungen an der KVS-Temperieranlage - aus dem gefrorenen Produkt zu entnehmen.

**Abbildung III-8 a-c**

*Die Produktlösung friert langsam von Außen nach Innen ein (von links nach rechts).*



#### 2.2.2. Versuchsdurchführung und Probennahme

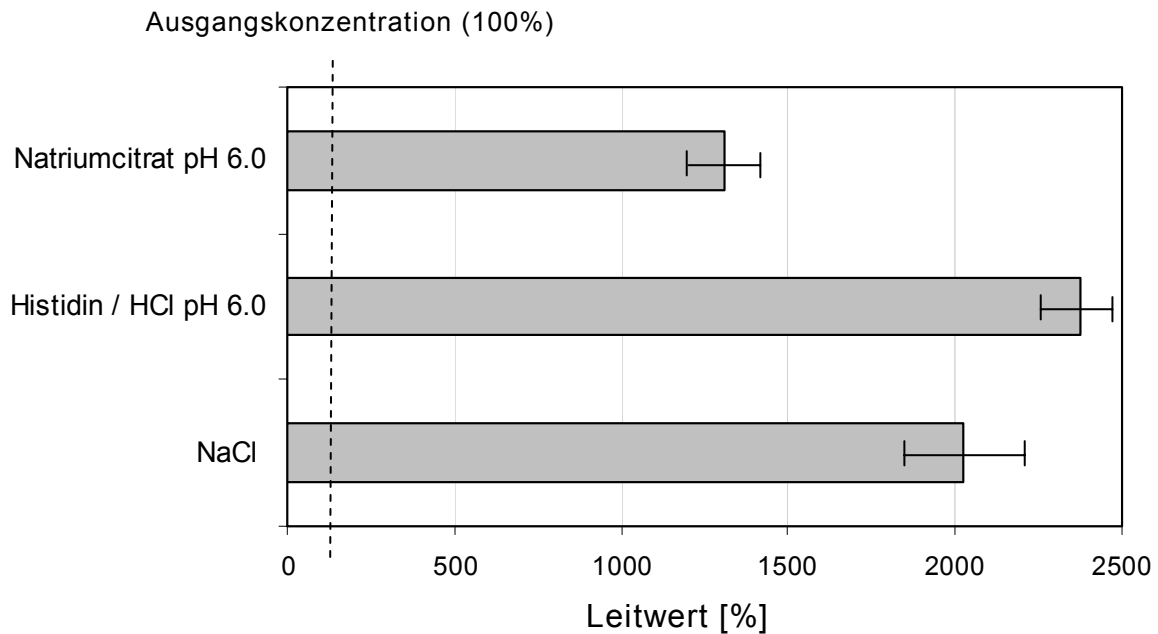
Die zu untersuchenden Lösungen wurden im 20-Zoll CryoWedge™ mit dem Standardeinfrierprogramm von Integrated Biosystems® auf -50°C durchgefroren und anschließend bei -20°C Proben gezogen. Die am besten reproduzierbaren Werte für die Konzentrationsbestimmung wurde bei Probenahme mit einem Spiralbohrer (Durchmesser 0.5 cm) gefunden. Alle peripheren Proben zeigten nur sehr geringe Abweichungen vom Initialwert, die z. T. unterhalb der Messtoleranz der Konzentrationsbestimmung lagen. Trotz dieser nur geringfügigen Abreicherung der Lösungsbestandteile in den äußeren Bereichen des Produktlösung war in der worst case Zone eine deutlich Zunahme der Konzentration an Elektrolyten und Protein feststellbar [120]. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen vornehmlich die Daten der worst case Zone ausgewertet und genauer untersucht.

#### 2.2.3. Cryokonzentrationseffekte verschiedener Puffermedien

Verschiedene Puffermedien (jeweils 100 mM) wurden im CryoWedge™ eingefroren und anschließend die Konzentration der Lösungsbestandteile in der worst case Zone mittels Leitwertmessung bestimmt. Abbildung III-9 zeigt, dass das Ausmaß der Aufkonzentrierung der verschiedenen Medien deutlich variiert. Während die Elektrolytkonzentration von Histidinhydrochlorid im worst case Bereich 24-fach höher war als die Ausgangskonzentration, wurde im Natriumcitratpuffer nur ein 12-fach höherer Wert als in der Ausgangskonzentration nachgewiesen. Es ist also eine dramatische Konzentrationsvervielfachung in diesem Bereich der Lösung nachweisbar.

**Abbildung III-9**

*Gefundene Konzentration (Leitwert) von Elektrolyten im worst case Bereich des 20 Zoll CryoWedgeT<sup>M</sup>. Histidinhydrochlorid zeigt eine stärkere Aufkonzentrierung als Natriumcitratpuffer (n=3).*



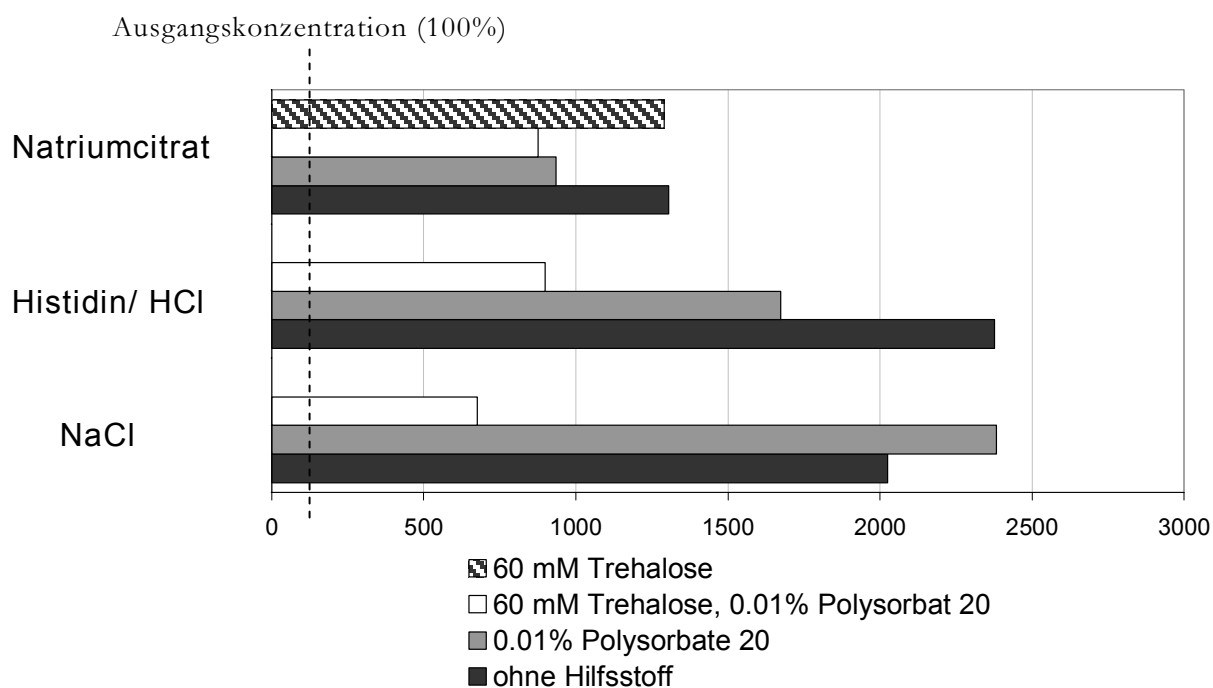
Es war interessant die Frage zu klären, ob durch Zusätze von bekanntermaßen cryoprotektiv wirkenden Hilfsstoffen eine Reduktion der gefunden Konzentrationseffekte zu erwarten sei.

#### 2.2.4. Einfluss von cryoprotektiven Additiven auf die Cryokonzentrationseffekte

Die Konzentration der Elektrolyte im worst case Bereich wurde unter Zusatz von Trehalose (60 mM) und Polysorbat 20 (0.01%) erneut mittels Leitwertmessung bestimmt. Da sowohl Trehalose als auch Polysorbat im Wasser nicht dissoziieren, war eine Beeinflussung des Leitwerts nicht zu erwarten. Dies wurde experimentell bestätigt. Abbildung III-10 zeigt die Konzentrationseffekte in Gegenwart von Trehalose und Polysorbat. Allerdings konnte keine allgemeine Gesetzmäßigkeit gefunden werden. Am Beispiel der Natriumchloridlösung ist dies sehr gut erkennbar. Während unter Zusatz von Polysorbat 20 sogar eine leichte Zunahme der Konzentrationseffekte feststellbar war, konnte in Gegenwart von Trehalose und Polysorbat 20 ein deutliche Reduktion nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Phänomen war im Histidinhydrochlorid Puffer erkennbar. Allerdings hatte Trehalose allein auf die Cryokonzentration von Natriumcitrat keinen Einfluss.

**Abbildung III-10**

*Einfluss von Trehalose und Polysorbat 20 auf Cryokonzentrationseffekte im 20-Zoll CryoWedge™. Dargestellte Wert in %-Leitfähigkeit vom Ausgangswert (100%)*

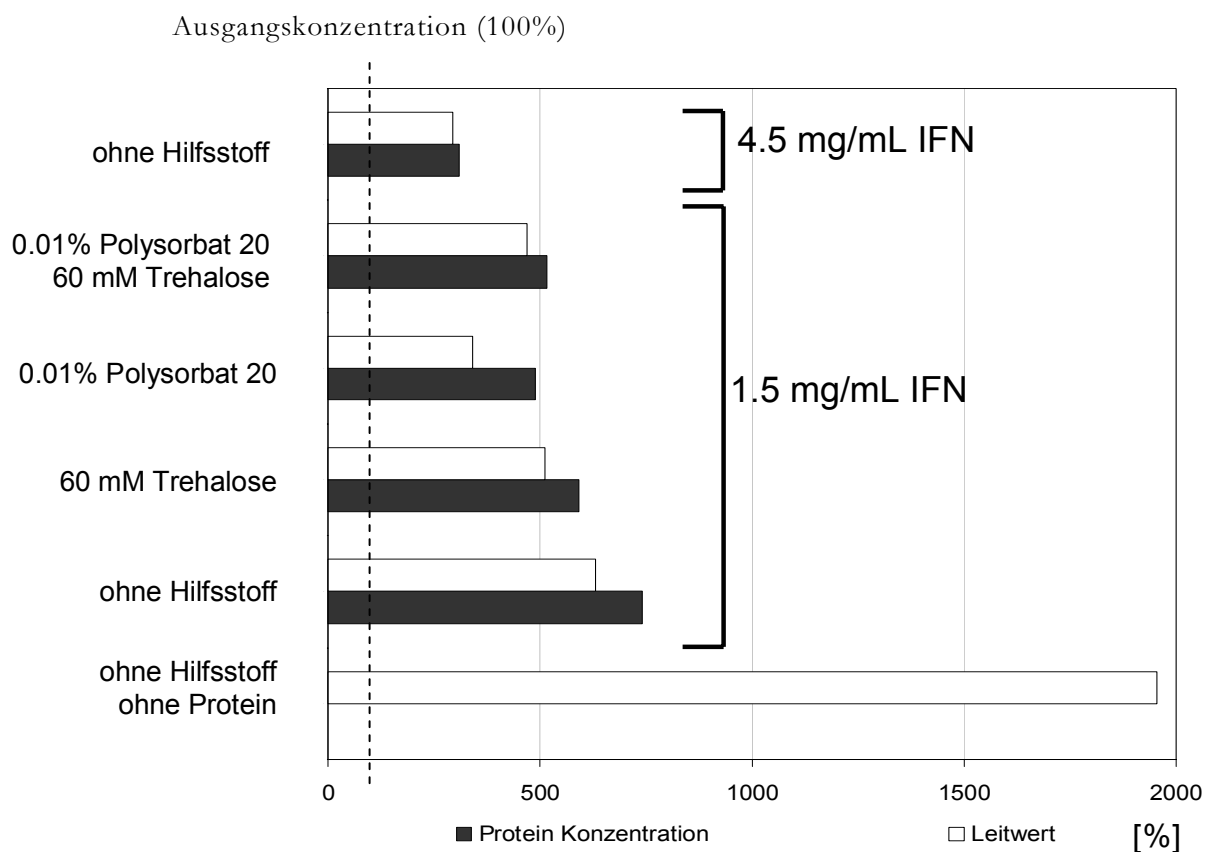


### 2.2.5. Cryokonzentration von proteinhaltigen Puffermedien

Der Einfluss der Hilfsstoffe auf die Cryokonzentration von Interferon Bulklösung wurde ebenfalls untersucht. Die reine Pufferlösung (120 mM Natriumchlorid, 25 mM Ammoniumacetat, pH 5.00) zeigt eine deutlich stärkere Aufkonzentrierung als Puffer mit 1.5 mg/mL Interferon. Die Zugabe von Polysorbat 20 oder Trehalose beeinflusst die Cryokonzentration nur unmerklich. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration von 1.5 mg/mL auf 4.5 mg/mL Interferon reduziert den Konzentrationseffekt hingegen nochmals deutlich (Abbildung III-11).

#### Abbildung III-11

*Cryokonzentration im 20-Zoll CryoWedge™ von Interferon Bulklösung. In Gegenwart von Interferon wurde sowohl der Leitwert als auch die Proteinkonzentration bestimmt. Alle Angaben in % vom Ausgangswert (100%).*

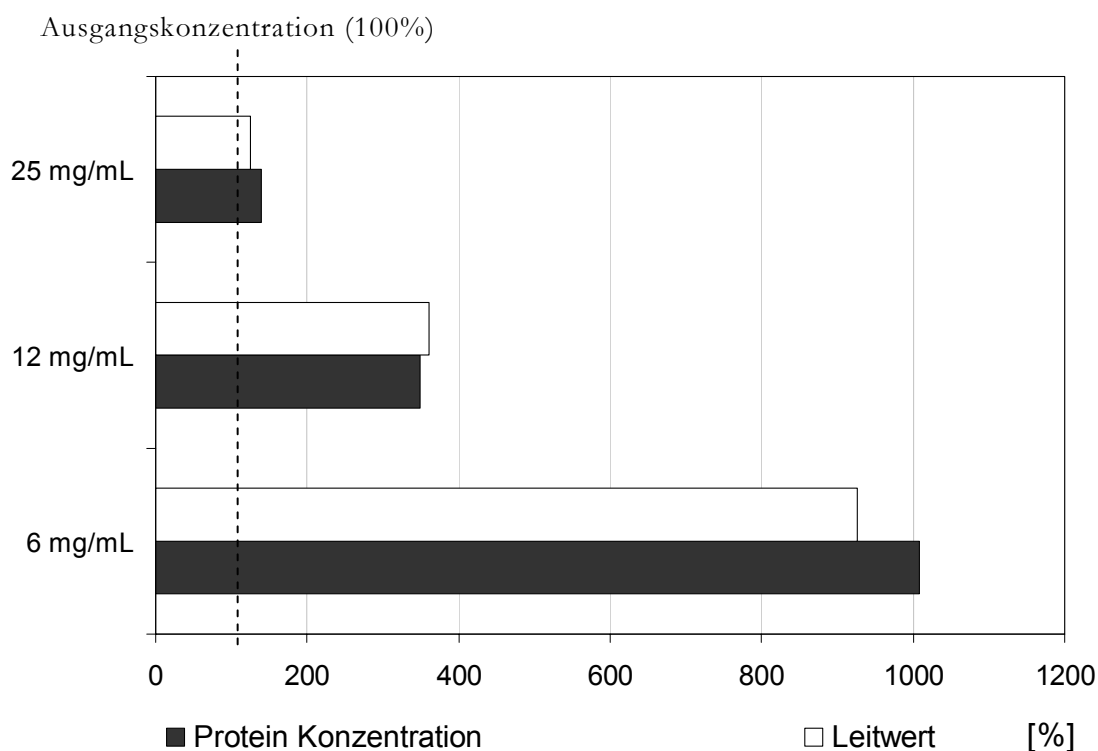


Um den bisher beobachteten Effekt, dass mit zunehmender Proteinkonzentration die Cryokonzentration der gelösten Bestandteile deutlich abnimmt zu verifizieren, wurde eine erneute Versuchsreihe mit Trastuzumab Bulklösung durchgeführt. Der Antikörper war in

einem Puffer aus 50 mM Histidinhydrochlorid pH 6.0, 60 mM Trehalose und 0.01% Polysorbat 20 gelöst. Hierbei zeigt sich sehr deutlich, dass mit Erhöhung der Antikörperkonzentration auf 25 mg/mL die Cryokonzentration auf weniger als das zweifache reduziert wird (Abbildung III-12).

### Abbildung III-12

*Cryokonzentration von Trastuzumab Bulklösung im 20-Zoll CryoWedge™ bei unterschiedlicher Antikörperkonzentration (25.0, 12.0 und 6.0 mg/mL Trastuzumab). Alle Angaben in % vom Ausgangswert (100%).*



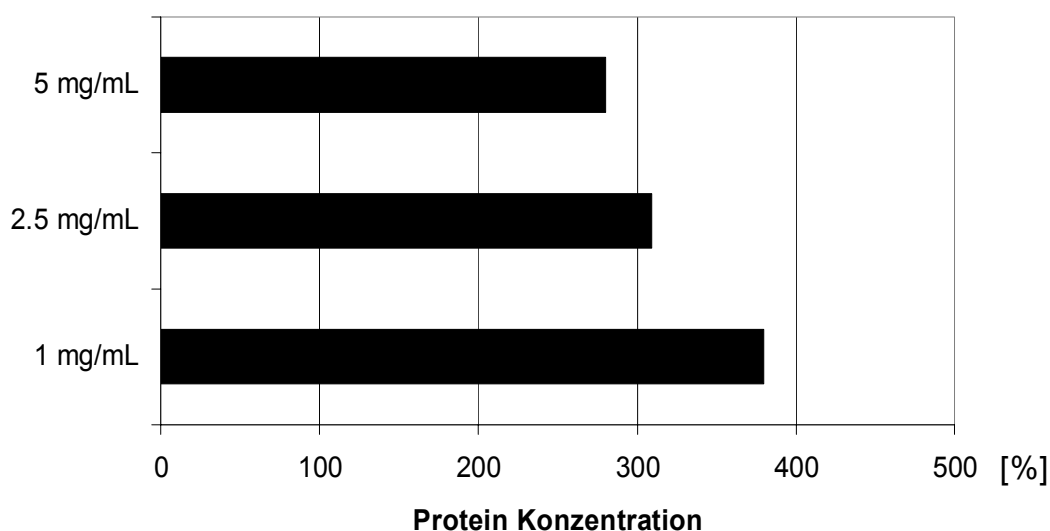
Die Versuche mit Interferon und Trastuzumab Bulklösung belegen einen Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und dem Faktor der Aufkonzentrierung der Lösungsbestandteile. Allerdings zeigten die bisher verwendeten Proteine in der SE-HPLC Analytik keinerlei Anhaltspunkte für Instabilitäten selbst nach mehreren Einfrierzyklen im CryoWedge™

Im Rahmen der Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung für die Bulklösung des Antikörpers Daclizumab (Zenapax®) bot sich die Möglichkeit, in der noch nicht stabilisierten Lösung das Aggregationsverhalten und gleichzeitig das Ausmaß der Cryokonzentration zu untersuchen um so Zusammenhänge aufzuzeigen zu können. Aus diesem Grund wurde die Daclizumab Lösung mehreren Einfrierzyklen im CryoWedge™ unterworfen, die

Cryokonzentrationseffekte und anschließend die Stabilität untersucht. Während des ersten Einfrierzyklus wurden die Proben aus dem worst case Bereich entnommen und Proteinkonzentration und Ausmaß der Aggregation ermittelt. Allerdings konnte die Probenahme so verfeinert werden, dass das Protein keinem physikalischen Scherstress mehr ausgesetzt war. Die genaue Versuchsbeschreibung und eine die Ergebnisse findet sich im Kapitel III.7.6. Wie in Abbildung III-13 ersichtlich, ist auch hier eine ähnliche Tendenz feststellbar. Mit zunehmender Antikörperkonzentration nimmt das prozentuale Ausmaß der Aufkonzentrierung ab.

#### Abbildung III-13

*Cryokonzentration von Daclizumab Bulklösung im 20-Zoll CryoWedge™ bei unterschiedlicher Antikörperkonzentration (5.0, 2,5 und 1.0 mg/mL Daclizumab). Alle Angaben in % vom Ausgangswert (100%).*



#### 2.2.6. Zusammenfassung

Die Versuche im 20 Zoll CryoWedge™ zeigen sehr deutlich, dass es während des Einfrierprozesses zu einer Aufkonzentrierung von Lösungsbestandteilen kommt. Auch durch das CryoFin™-Konzept können diese Phänomene nicht vollständig unterbunden werden. Allerdings zeigen die Konzentrationsbestimmungen der Proben, die nicht aus dem worst case Bereich des CryoWedge™ gezogen wurden, dass nur ein geringer Bruchteil der Lösungsbestandteile aufkonzentriert wird. Die Konzentrationswerte der „peripheren“ Proben weichen nur um maximal 5% von der initialen Lösungskonzentration ab. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe bestätigen diese Beobachtung [120].

Allerdings ist zu beachten, dass die hier untersuchten worst case Proben mit einem Volumen von weniger als 0.5% des Gesamtvolumens nur den höchstkonzentrierten Bereich wiedergeben. Ein Konzentrationsgradient der sich durch den gesamten Querschnitt des CryoWedge™ zieht konnte nicht gefunden werden.

### 2.3. Diskussion

In beiden Einfriersystemen sind Cryokonzentrationsphänomene nachweisbar. Ein direkter Vergleich erscheint schwierig, da die Form des gefrorenen Produktes vollkommen unterschiedlich ist. Hinzu kommt, dass in der KVS-Temperieranlage eine Verteilung der aufkonzentrierten Proteinlösung über die gesamte Innenoberfläche des Eiszylinders stattfindet. Die Probenahme kann daher nur stichprobenartig erfolgen. Um ein für die Konzentrationsbestimmung ausreichend großes Probenvolumen zu erhalten, muss die Probe eine gewisse Mindestschichtdicke aufweisen bzw. von einer relativ großen Fläche abgenommen werden. Unvorhersehbare Verdünnungseffekte sind hierbei nicht auszuschließen.

Im Gegensatz hierzu bietet das CryoWedge™ die Möglichkeit, die hochkonzentrierte Proteinlösung optisch genau zu erkennen und gezielt zu untersuchen. Eine standardisierte Probenahme ist über einen festgelegten Durchmesser der Probenbohrung möglich. Jedoch ist auch hier zu beachten, dass die gemessene Proteinkonzentration keineswegs den höchsten Wert darstellt, dem das Protein gegen Ende des Einfrierprozesses ausgesetzt ist. Auch hier ist anzunehmen, dass eine nochmalige Verringerung des Probendurchmessers eine Zunahme der messbaren Konzentration zur Folge hätte.

Vergleicht man die Volumenanteile der Produktlösung, die bei erhöhter Ausgangskonzentration einfrieren, so stellt man fest, dass im Eiszylinder der KVS-Anlage ca. 15% der Gesamtlösung bei mindestens verdoppelter Proteinkonzentration einfrieren, im CryoWedge™ nur weniger als 1%.

Die optische Betrachtung des Einfrierprozesses mit der Ausbildung langer Eisdendrite legt die Schlussfolgerung nahe, dass die hier beobachtete Aufkonzentrierung lediglich die makroskopisch nachweisbare Cryokonzentration darstellt. Würde man das Probenahmevolumen schrittweise weiter verkleinern, würden Cryokonzentrationseffekte im mikroskopischen Bereich erkennbar werden: Neben Bereichen, die glasartig erstarrte hochkonzentrierte Proteinlösung enthalten, wären nahezu reine Eis- und Salzkristalle nachweisbar.



### **3. Stabilität von Interferon alfa-2a Bulkwerkstofflösung während Einfrierprozessen in KVS-Temperieranlagen**

Die Interferon alfa-2a Bulklösung wird bei der Fa. Hoffmann-LaRoche, Basel hergestellt und nach vollständiger Aufreinigung des Proteins in kleinvolumigen Kunststoffflaschen auf -80°C konventionell tiefgefroren. Im Rahmen eines Produktionstransfers sollte überprüft werden, ob die neuen KVS-Temperieranlagen für das Einfrieren und Auftauen von Interferon Bulklösung geeignet sind. Zu diesem Zweck war die Stabilität von Interferon Bulk in der vorgegebenen Formulierung während wiederholter Einfrier- und Auftauzyklen zu überprüfen. Für den Fall einer erkennbaren Instabilität sollten die verantwortlichen Parameter ermittelt und gegebenenfalls optimiert werden.

Da die Verfügbarkeit von Interferon Bulklösung aufgrund der Produktionskapazität und hoher Nachfrage begrenzt war, sollten Vorversuche mit geringem Beladungsvolumen mögliche Instabilitäten aufzeigen. Aufgrund der langen Prozesszeiten und der zu erwartenden Einfrierphänomene war als worst case Szenario das Einfrieren und Auftauen bei Maximalbefüllung von 15L Bulklösung je Edelstahlbehälter zu erkennen. Der hohe Materialeinsatz an Produktlösung erlaubte jedoch nur wenige Versuche unter diesen worst case Bedingungen.

### 3.1. Vorversuche bei geringem Beladungsvolumen von 4L

#### 3.1.1. Versuchsdurchführung

Um erste Stabilitätsdaten von Interferon Bulk während mehrerer Einfrier- und Auftauzyklen zu erhalten, wurden diese Versuche mit geringem Befüllvolumen von 4 L Lösung in einem Edelstahlbehälter durchgeführt. Die Interferonlösung wurde in einen Edelstahlbehälter abgefüllt, vier Einfrier-Auftauzyklen in der KVS-Anlage unterzogen und nach jedem Zyklus wurden Proben gezogen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter keimarmen Bedingungen durchgeführt. Der Interferon Bulk wurde mit einem Einfrierprogramm auf  $-75^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend mit wieder aufgetaut. Die Temperatur im Produkt überstieg zu keinem Zeitpunkt  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$ .

Die Proben wurden hinsichtlich Proteinkonzentration ( $\text{OD}_{280}$ ), Trübung, Oxidation (RP-HPLC) und Aggregation (SE-HPLC) untersucht.

**Tabelle III-4**

*Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von 4L Interferon-Lösung in KVS-Temperieranlage*

Proben- bezeichnung	Protein- Konzentration $\text{OD}_{280}$	Trübung TE(F)	RP-HPLC ox. Interferon [Flächen-%]	SE-HPLC Dimer [Flächen-%]
Ausgangswert	1.2	0.6	1.2	0.2
1. Zyklus	1.2	1	1.1	0.3
2. Zyklus	1.2	0.7	1.1	0.7
3. Zyklus	1.2	0.6	1.2	1.0
4. Zyklus	1.2	1.8	1.2	0.2

#### 3.1.2. Ergebnisse:

Wie zu erwarten war, konnte mittels RP-HPLC keine Hinweise auf Oxidation von Interferon gefunden werden (Tabelle III-4). Die Messwerte der Trübungsmessung zeigten bis auf eine leichte Erhöhung des Trübungswertes nach dem 4. Einfrierzyklus keine Hinweise, die auf eine Bildung von nennenswerten Mengen unlöslicher Aggregate oder Präzipitate schließen ließen. Durch optisch visuelle Kontrolle konnten ebenfalls keine Schwebeteilchen oder Opaleszenzen erkannt werden. Die Ergebnisse der SE-HPLC waren uneinheitlich: Während

die Werte nach Bulkabfüllung und am Ende der Versuchsreihe identisch waren, schienen eine vorübergehende Zunahme von Dimeren feststellbar. Eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse war nicht möglich, die Wiederholung der Analysen bestätigten die Ergebnisse der ersten Messreihe. Eine Versuchswiederholung war zu diesem Zeitpunkt aufgrund der Verfügbarkeit von Interferon-Lösung nicht möglich. Die Versuche wurden bei erhöhtem Befüllvolumen, also unter den aussagekräftigeren worst case Bedingungen wiederholt.

### 3.2. Stabilitätsuntersuchung unter worst case Bedingungen: Interferon-alfa2a Bulk bei 15L Befüllvolumen in KVS- Temperieranlage

#### 3.2.1. Versuchsdurchführung

Während die Vorversuche für Interferon bei Minimalbefüllung der Edelstahlbehälter keinen eindeutigen Hinweis auf Instabilitäten in Form von Aggregation oder Trübung ergaben, zeigten sich bei einem Befüllvolumen von 14.5 L Bulk im Edelstahlbehälter eindeutige Anzeichen für die Bildung von Partikeln. Es wurden 2 Behälter mit Interferon Bulklösung zeitgleich Einfrier- und Auftauzyklen unterworfen. Einer der beiden Behälter (Container A) enthielt Interferon Bulklösung in der bekannten Formulierung (Natriumchlorid / Ammoniumacetat Puffer, pH 5.0). Der zweite Container (Container B) war mit einer Interferon Lösung in veränderter Formulierung (pH-Wert 4.5) beladen. Bei diesem Material handelte es sich um Interferon aus einem anderen Prozess, das für die Versuchszwecke geeignet schien. Die Details der Versuchsdurchführung sind in Tabelle III-5 dargestellt. Geplant waren fünf Einfrierzyklen, jedoch zeigte sich bereits nach dem ersten Auftauen eine deutliche Trübung, daher wurden keine weiteren Einfrierzyklen durchgeführt. Statt dessen folgten eine Lagerung bei +5°C in der KVS-Temperieranlage unter ständiger Rotationsbewegung und weitere Versuche.

**Tabelle III-5**

*Zusammensetzung und Befüllvolumen der Stabilitätsversuche: Interferon Bulklösung in KVS-Temperieranlage*

	Container A	Container B
Verwendetes Interferon-Material:	Interferon alfa-2a	Interferon alfa-2a
Volumen [L]	14,5	14,2
Konzentration [mg/mL]	1,38	1,4
pH-Wert	5,0	4,5

### 3.2.2. Ergebnisse

Bereits während der ersten Probenahme konnte durch optisch-visuelle Kontrolle eine deutliche Trübung der Lösung in **Container A** festgestellt werden, wohingegen **Container B** eine klare Lösung enthielt. Aus diesem Grund wurde anstelle einer Trübungsmessung eine Partikelanalyse mittels Lichtblockade durchgeführt. Die Lichtblockademessung zeigte sehr hohe Mengen an unlöslichen Schwebeteilchen (Abbildung III-14). Im Vergleich hierzu war die Anzahl der unlöslichen Partikel im Container B deutlich geringer. Die Ergebnisse der RP-HPLC und SE-HPLC auf Di- und Oligomere gaben keinerlei Hinweise auf einen Abbau des Proteins (Tabelle III-6).

Nach fünftägiger Lagerung der beiden Behälter in der Temperieranlage bei +5°C und täglichem Probenzug stellte sich heraus, dass diese Partikelbildung kein vorübergehendes oder reversibles Phänomen war. Im Container A nahm die Größe und Anzahl der Partikel in diesem Zeitraum nicht ab, es waren vielmehr Alterungserscheinungen, wie Größenumverteilung und Größenzunahme feststellbar.

**Tabelle III-6**

*Ergebnisse der Gehaltsbestimmung, RP-HPLC und SE-HPLC: Ausgangs- und Endwert*

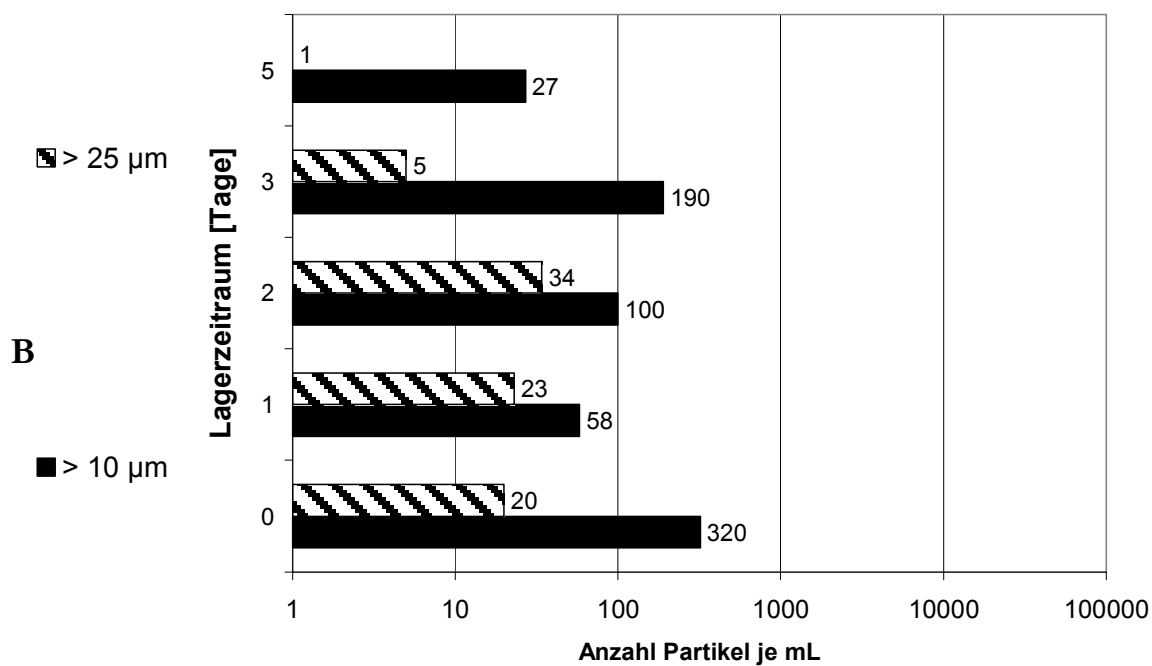
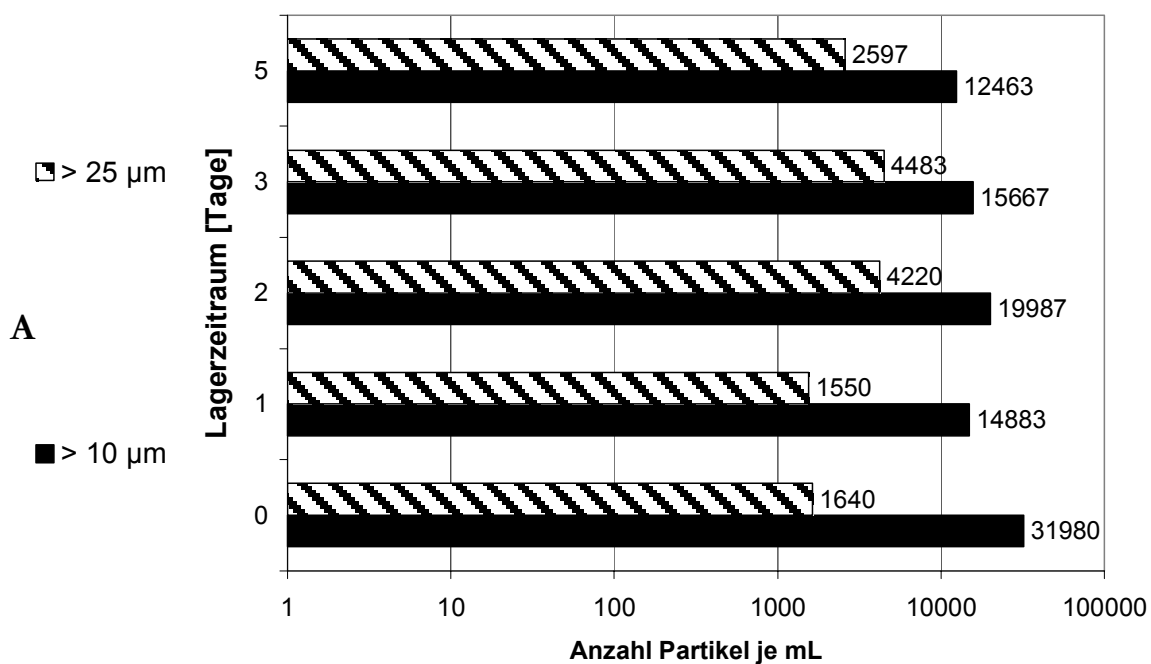
Probenbezeichnung	Protein-Konzentration	oxidiertes Interferon [Flächen-%]	Dimer [Flächen-%]
<b>Container A</b>			
Ausgangswert	1.38	1,1	0.2
nach Einfrieren	1.38	1,1	0.2
<b>Container B</b>			
Ausgangswert	1.40	1,2	0.3
nach Einfrieren	1.40	1,2.	0.3

Abbildung III-14

Partikelbildung in Interferon Bulklösung nach Einfrierzyklen in KVS-Temperieranlage direkt nach dem Auftauen (Tag 0) und im Verlauf fünftägiger Lagerung.

A: Container A (pH 5.0)

B: Container B (pH 4.5)



Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie geben in beiden Fällen keinen Hinweis auf eine Zunahme an Dimeren oder Oligomeren durch den Einfrierprozess oder während der anschließenden Lagerung. Auch die Ergebnisse der SDS-Gelelektrophorese zeigten keine ungewöhnliche Befunde und entsprachen der Anforderung hinsichtlich Reinheit.

Um die Menge an aggregiertem Protein zu quantifizieren wurde die Proteinkonzentration der Lösung aus Container A vor und nach Filtration (0.2  $\mu\text{m}$ ) photometrisch bei  $\lambda=280\text{ nm}$  bestimmt. Die Abnahme der Proteinkonzentration um 2% (von 1.38 auf 1.35 mg/mL) war gering, jedoch signifikant (Tabelle III-7). Es ist somit festzuhalten, dass zwischen beiden Containern ein deutlicher Unterschied bestand. Während Container A (pH 5.0) deutliche Präzipitatbildung aufwies, die von ca. 2 % des Gesamtproteingehalts verursacht wurden, zeigte Container B keine Hinweise auf Instabilitäten.

**Tabelle III-7**

*Quantifizierung des präzipitierten Proteinanteils photometrisch bei 280nm vor und nach Filtration (0.2  $\mu\text{m}$ )*

<i>IFN-Bulklösung aus</i>	<i>Proteinkonzentration</i>
<i>Container A</i>	<i>(OD 280 nm)</i>
<i>vor Filtration</i>	<i>1,38</i>
<i>nach Filtration</i>	<i>1,35</i>

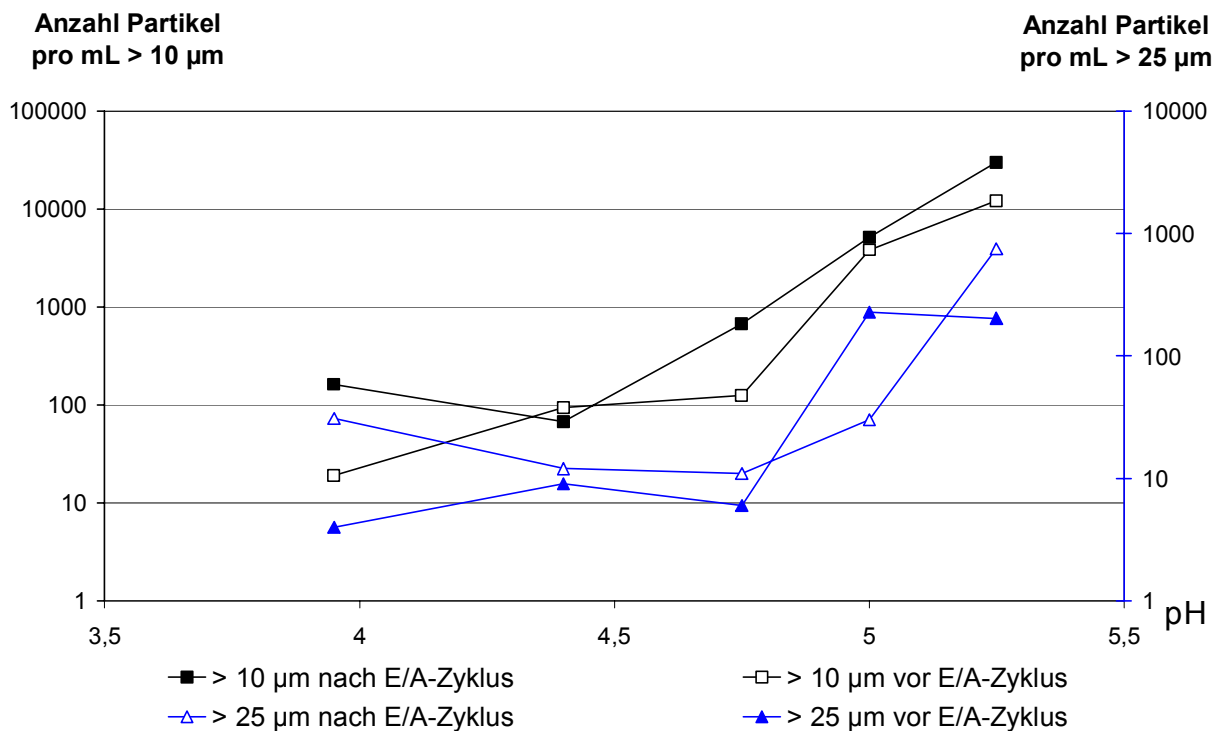
### 3.2.3. *pH-Abhängigkeit der Interferon-Trübung*

Um chargenspezifische Einflüsse auszuschließen und der Vermutung nachzugehen, der pH-Werte der Lösung könnte den entscheidenden Einfluss auf die Partikelbildung haben, wurde der pH-Wert einer Probe der Interferon-Lösung aus Container A auf 4.4 abgesenkt. Bereits kurz nach Zugabe konnte optische eine Auflösung der Partikel beobachtet werden. Die Trübung wurde nach Säurezugabe in Abständen von 2 Minuten wiederholt bestimmt, anschließend auch eine Partikelmessung durchgeführt (Tabelle III-8). Hierbei war ein deutlicher Rückgang der Trübung und auch der Partikelzahlen zu erkennen. Die Ergebnisse sind nahezu identisch mit den Messwerten aus Container B.

**Tabelle III-8***Veränderung der Partikelzahlen und Trübung nach pH-Wert Absenkung*

<b>Trübung und Partikel vor und nach pH-Wert-Absenkung von 5,0 auf 4,4</b>			
Zeit nach HCl-Zugabe	Trübung [TE (F)]	Partikel	
		> 10 µm	> 25µm
Vor Zugabe	5,3	14883	1550
2 Minuten	0,9	228	5
4 Minuten	0,8		
6 Minuten	0,7		

Um den Einfluss des Einfrierprozesses auf die Partikelbildung bei Unterschiedlichen pH-Werten weiter zu untersuchen, wurde der Container A erneut mehreren Einfrier- und Auftauzyklen bei pH-Werten zwischen 4,0 und 5,25 unterworfen. Hierbei wurde die Anzahl der unlöslichen Schwebeteilchen jeweils vor und nach dem Einfrieren bestimmt (Abbildung III-15).

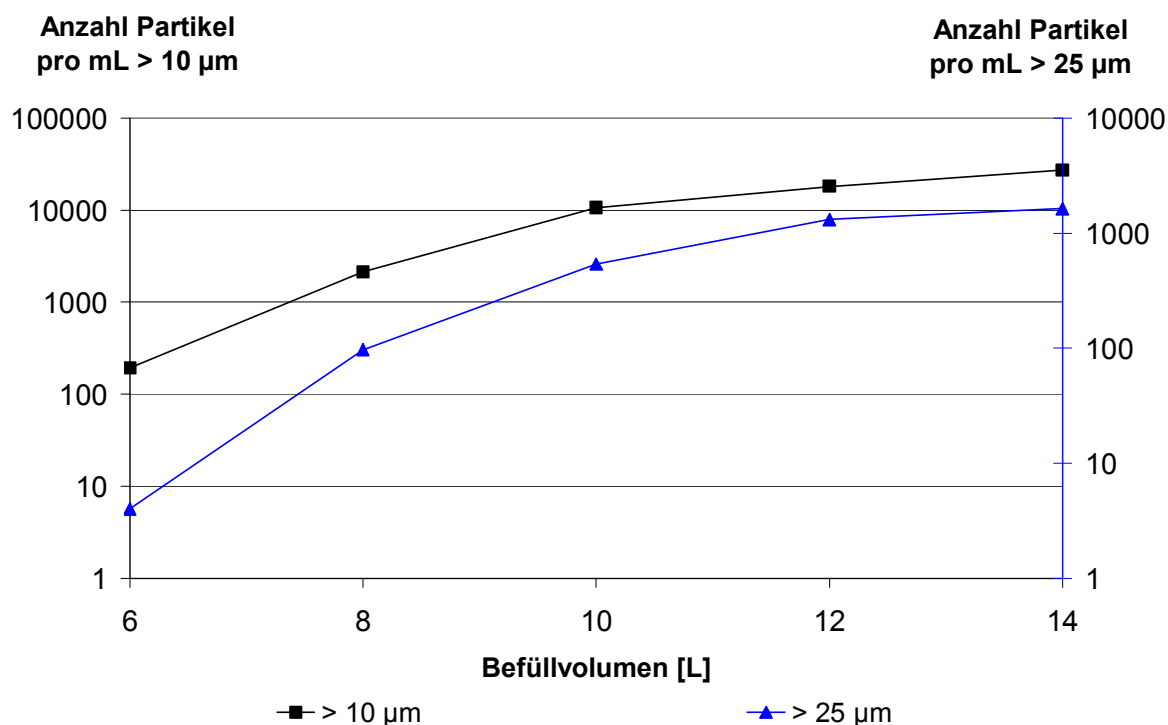
**Abbildung III-15***Verlauf der Partikelbildung in Abhängigkeit des pH-Wertes vor und nach einem Einfrier- und Auftauzyklus in der KVS-Temperieranlage*

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen pH-Wert Erhöhung und Zunahme der Partikelbildung und somit auf das Ausmaß der Präzipitation war erkennbar. Allerdings war damit nicht geklärt, warum Interferon, das in kleinvolumigen Kunststoffflaschen konventionell oder auch in geringeren Volumina in der KVS-Anlage eingefroren und wieder aufgetaut wurde, keine Trübung zeigt. Es müssen also während des Einfrierens von großen Volumina in der KVS-Anlage weitere Stressfaktoren auf das Protein wirken. Auffälligster Unterschied zum Prozess bei geringer Behälterbefüllung ist die verlängerte Prozesszeit. Allerdings wird diese beim konventionellen Einfrieren und Auftauen bei weitem überschritten. Zwei Faktoren, die bisher nicht untersucht wurden, sind die Cryokonzentrationseffekte während des Einfrierens in der KVS-Anlage sowie der Scherstress, dem die Proteinlösung während der Prozessierung unterliegt.

#### *3.2.4. Einfluss des Befüllvolumens der Edelstahlbehälter auf die Präzipitation*

Wie der Versuch mit nur 4 L Interferon Bulklösung gezeigt hatte, war bei geringem Befüllvolumen der Edelstahlbehälter keine nennenswerte Präzipitation des Proteins erkennbar. Aus diesem Grund wurden mehrere Einfrierversuche mit unterschiedlichem Befüllungsgrad (4, 6, 8, 10, 12 und 14 L) an Interferon Lösung in der KVS-Temperieranlage durchgeführt. Abbildung III-16 zeigt sehr deutlich, dass mit zunehmenden Befüllvolumen auch das Ausmaß der Präzipitation dramatisch um bis zu vier Zehnerpotenzen zunimmt.



**Abbildung III-16***Einfluss des Befüllvolumens auf das Ausmaß der Präzipitation von Interferon***3.2.5. Bestimmung der Cryokonzentration von Interferon Bulklösung**

Interferon Bulklösung zeigt in dem vorliegenden Puffer bei einem pH von 5.0 ab einer Konzentration von mehr als 8 mg/mL spontane Trübungserscheinungen. Um abzuklären, ob die Partikelbildung durch eine starke Aufkonzentrierung des Proteins während des Einfrierprozesses in der KVS-Anlage ausgelöst werden könnte, wurde die Konzentrationsverteilung in dem gefrorenen Produkt nach dem Einfrieren untersucht. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind auch im Kapitel III.2 enthalten. Dort ist die Art der Probenahme genau beschrieben.

Der Versuch wurde bei einem Befüllvolumen von 14.5 L Interferon Bulklösung (Proteinkonzentration 1.38 mg/mL) durchgeführt. Zur Probenahme wurde der Behälter in einen Tiefkühlraum (-20°C) transferiert und geöffnet. Eine Versuchsdurchführung bei minimalem Befüllvolumen erschienen nicht sinnvoll, da Vorversuche mit Pufferlösung eine maximale Schichtdicke der Eiszyinders von nur 1.5 cm aufwiesen.

Nach Öffnen des Zylinder zeigte sich, dass an der Innenwand des gefrorenen Eiszyinders geringe Anteile von gefrorenem Schaum vorhanden waren. Diese innerste Schicht wurde durch Kratzen ebenfalls gewonnen. Die Schichtdicke war hierbei jedoch mit 1-2 mm sehr gering.

Es zeigte sich, dass sich innerhalb des Eiszylinders ein deutlicher Konzentrationsgradient ausgebildet hatte (Tabelle III-9). Im Laufe des Einfrierprozesses kam es zu einer Aufkonzentrierung des Proteins. Während die Schichten D bis B, also die drei äußeren Schichten, die mehr als 80% des gesamten Produktvolumens umfassten, zwischen 1.1 und 1.25 mg/mL Protein enthielten, war in der innersten Schicht 2.9 mg/mL Interferon nachweisbar. Jedoch ist durch diese Art der Untersuchung in Schichtdicken von 1.5 cm mit einer starken Verdünnung von möglicherweise noch höher konzentrierten Anteilen zu rechnen. Diese Vermutung wurde durch Analyse des gefrorenen Schaums von der Zylinderinnenwand bestätigt: Dieser enthielt eine Interferonkonzentration von 6.6 mg/mL, war also um den Faktor 4.8 höher als die Ausgangskonzentration. Von den Proben wurde auch der Leitwert, der ein Maß für die Ionenkonzentration des Puffers darstellt, bestimmt. Es zeigte sich, dass Proteinkonzentration und Leitwert der Proben recht gut korrelierten. Der pH-Wert aller Proben lag zwischen 4.98 und 5.02. Die Ausbildung eines pH-Wert Gradienten im gefrorenen Produkt war also nicht nachweisbar.

**Tabelle III-9**

Ort der Probennahme	Proteinkonzentration Ausgangswert 1.38 mg/mL		Leitwert [%]	pH-Wert
	[mg/mL]	[%]		
Schicht A	2.92	220	205	5.01
Schicht B	1.25	91	88	4.98
Schicht C	1.14	83	74	5.00
Schicht D	1.11	80	68	5.02
Innenwand (1)	4.3	310	280	4.99
Behälterboden (2)	6.6	480	410	4.98

#### 3.2.6. Ermittlung von Grenzflächeneffekten auf die Partikelbildung

Während sämtlicher Prozessschritte in der KVS-Temperieranlage ist die Proteinlösung einer permanenten Rotationsbewegung ausgesetzt. Vorversuche zeigten zum Einen, dass die Rotationsbewegung alleine, wenn also ein mit Interferon Bulklösung (14.5 L) befüllte Edelstahlbehälter über 12 h bei konstant +5°C in der KVS-Anlage gedreht wurde, keine nennenswerte Präzipitation hervorrief. Zum anderen war die Bulklösung während eines statischen Einfrier- und Auftauprozesses in der KVS-Anlage ebenfalls stabil, also ohne

Präzipitatbildung. Für diesen Versuch wurde der Behälterantrieb der Anlage deaktiviert und das gefrorene Produkt in einem Kühlraum langsam aufgetaut. Hinzu kam, dass mittlerweile durchgeführte Versuche mit pegyliertem Interferon (Kapitel III.4), das aufgrund seiner chemischen Struktur zur Schaumbildung neigt, darauf hinwiesen, dass insbesondere während des Auftauens in der KVS-Anlage mit starken Turbulenzen und Durchmischungseffekten zu rechnen ist.

In der Literatur sind vielfältige Hinweise auf eine agitation-induced Aggregation von Proteinen wie z. B. PEG-GCSF, PEG-MGDF und OPG-Fc [111], sowie von Interferon- $\gamma$  [112] und Insulin [113-114] berichtet worden.

Daher sollte mit Hilfe einer Versuchsreihe, bei der bewusst eine Interaktion zwischen Proteinlösung und Headspace verursacht wurde, die Neigung von Interferon zur „agitation-induced“ Aggregation untersucht werden.

Um diesen Grenzflächeneffekt zwischen der Proteinlösung und dem Headspace des Produktbehälters, der immerhin auch bei Maximalbefüllung fast 50 % des Behältervolumens einnimmt, isoliert betrachten zu können, wurde der in Abbildung III-17 dargestellte Aufbau verwendet.

Das Modell bestand aus einem Labor Vortex Mischer, auf dem ein Probengefäß (50 mL Falcon-Röhrchen) fest angebracht wurde. Um eine Interaktion mit dem Headspace zu erreichen, wurde die Vortexgeschwindigkeit so justiert, dass gerade der Übergang von einer reinen Rotationsbewegung hin zu einer Schüttelbewegung mit Luftblaseneinschluss erreicht war. Die Versuche wurden bei +5°C durchgeführt, um einen Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Ergebnis auszuschließen. Die Probenahme fand alle 20 Minuten statt. Die Versuche wurde mit Interferonlösung bei einem pH-Wert von 4.5 und 5.0 durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden die Lösungen mittels eines Spritzenvorsatzfilter (0.2  $\mu\text{m}$ ) von Schwebeteilchen befreit.

Es zeigte sich, dass bereits kurz nach Versuchsbeginn eine deutliche Zunahme an Schwebeteilchen sowohl bei pH 4.5 und 5.0 zu verzeichnen war. Allerdings war bei einem pH-Wert von 4.5 bereits nach 20 Minuten das Höchstniveau erreicht, wohingegen die Anzahl der Partikel in der Proteinlösung bei pH 5.0 noch weiter um bis zu zwei Zehnerpotenzen zunahm (Abbildung III-18).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass Interferon bei einem pH-Wert von 5.0 eine höhere Sensitivität gegenüber agitation-induced Aggregation besitzt als bei 4.5.

Abbildung III-17

Versuchsaufbau zur Ermittlung von Grenzflächeninteraktion mit dem Headspace. Ein 50 mL Falcon-Röhrchen mit Produktlösung wurde auf einem Vortex Mischer befestigt.

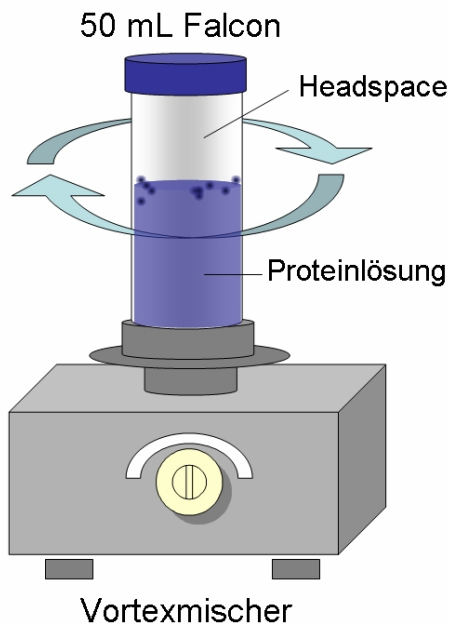
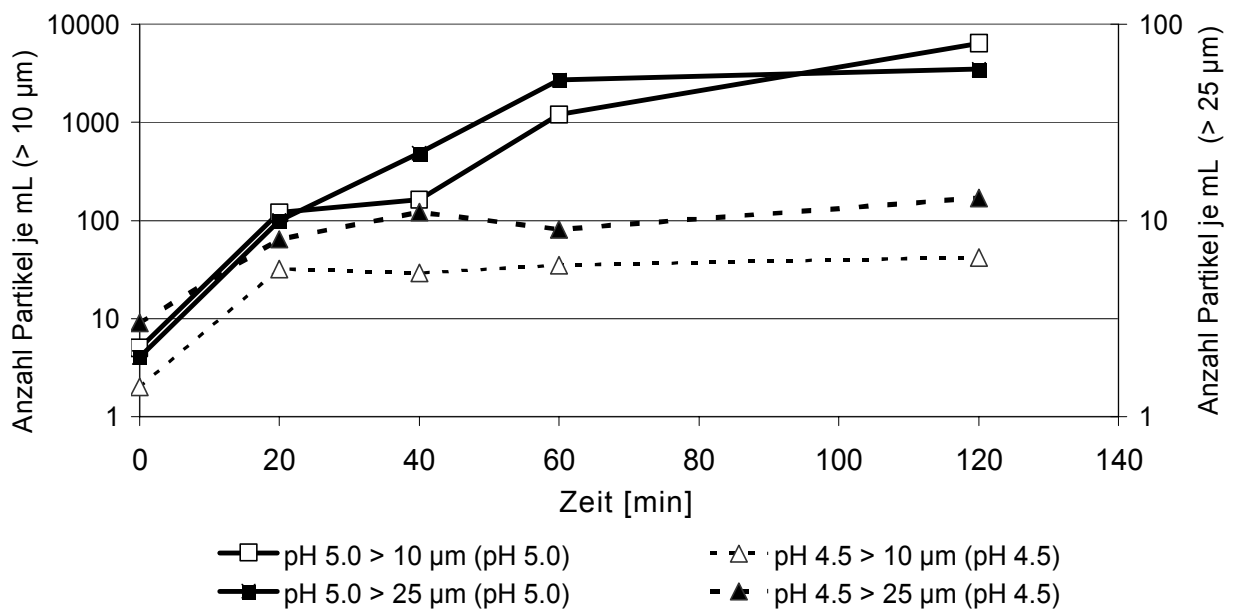


Abbildung III-18

Partikelbildung nach Vortex-Stress von Interferon Bulklösung bei pH-Werten von 4.5 und 5.0



### 3.2.7. Versuch zur Etablierung eines Scale Down Systems

Um die Ergebnisse der Einfrier-Auftauzyklen der KVS-Anlage mit geringeren Produktvolumina durchführen zu können wurde versucht, eine Art Miniatursystem zu entwickeln. Dieses bestand aus einem Rotavapor® mit einem Ethanol/Trockeneis Kältebad. An dem Rotavapor® war ein 50 mL Glaskolben befestigt, der als Produktbehältnis dienen sollte. Das Befüllvolumen des Glaskolbens betrug bei den Versuche 25 mL. Einen Überblick über die verwendeten Proteinlösungen gibt Tabelle III-10. Die Proben wurden nach 3 Einfrier- und Auftauzyklen mittels Lichtblockade vermessen. Es zeigte sich jedoch, dass keinerlei Instabilitäten in Form einer signifikanten Zunahme von Partikeln oder Aggregaten nachweisbar waren. Die Versuche wurden aus diesem Grund nicht weitergeführt. Die Verwendung einer konzentrierten Proteinlösung mit bis zu 6.6 mg/mL Interferon sollte eine Simulation des worst case Bereichs, also der innersten Produktschicht darstellen. Die gemessenen Partikelwerte waren vergleichbar mit Interferon Bulklösung, die statisch in kleinvolumigen Gefäßen eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Die Partikelwerte nach einem Einfrierzyklus in der KVS-Anlage lagen mehr als eine Zehnerpotenz darüber.

**Tabelle III-10**

*Ergebnisse der Partikelmessungen nach Einfrierauftauzyklen im Rotavapor*

Nr.	Proteinkonzentration	Puffermedium	Partikel		
			> 1 $\mu\text{m}$	> 10 $\mu\text{m}$	> 25 $\mu\text{m}$
1	1.38 mg/mL	Bulkpuffer pH 5.0	96203	211	32
2	6.6 mg/mL	Bulkpuffer pH 5.0	214320	412	44
3	6.6 mg/mL	Bulkpuffer pH 5.0 4.1-fach konzentriert	198542	356	67

Wie bereits die Versuche bei unterschiedlichen Befüllvolumina sehr deutlich zeigt, scheinen bei Maximalbefüllung eine Häufung von verschiedenen Stressfaktoren aufzutreten, die mit Hilfe von Labormodellen nicht realitätsnah simuliert werden können.

Aus diesem Grund wurde der Versuch, dieses Miniatursystem weiter zu entwickeln, fallen gelassen. Stattdessen sollte das Puffersystem der Bulklösung thermodynamisch charakterisiert werden.

### 3.3. Untersuchungen am Puffersystem

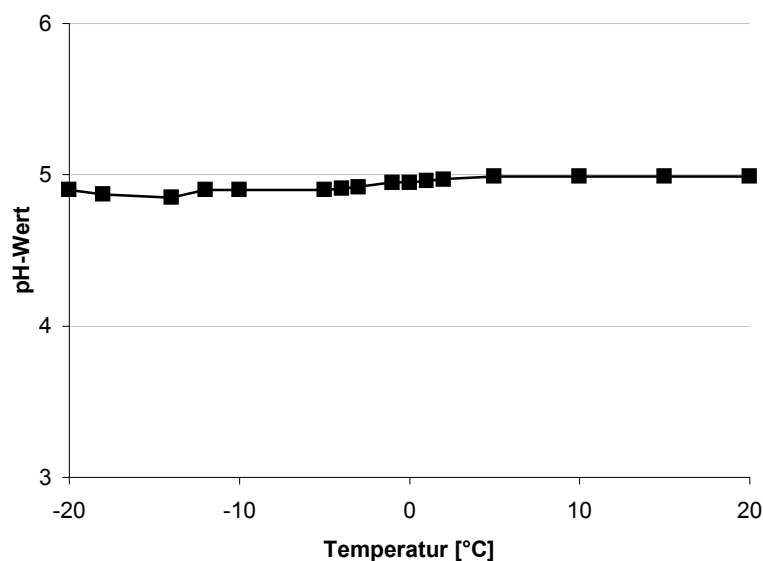
Um Einflüsse des Puffermediums auf die Stabilität des Proteins zu untersuchen, wurde das Puffermedium bestehend aus Ammoniumacetat und Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 5.0 mittels pH-shift und DSC näher charakterisiert. Ziel der Versuchsreihe war es, mögliche stabilitätsbeeinflussende Faktoren wie pH-Wert Veränderungen zu erfassen. Darüber hinaus sollte die Existenz thermodynamischer Übergänge im Temperaturbereich zwischen  $-70^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$  ermittelt werden. Hintergrund dieser Untersuchung war die Bewertung von kurzzeitigen Produkterwärmungen auf bis zu  $-30^{\circ}\text{C}$ , die aufgrund betrieblich notwendiger Transporte und Umlagerungen nachweisbar sind.

#### 3.3.1. *pH-shift Messung*

Theoretische Erwägungen legen die Vermutung nahe, dass während des Einfrierens von Natriumchlorid/Ammoniumacetat-Puffer aufgrund der einprotonigen Säure keine pH-Wert-Verschiebungen auftreten sollten. Selbst wenn eine Pufferkomponente auskristallisiert, ist keine Zweite in Lösung vorhanden, die den pH-Wert verändern könnte. Dies konnte mittels pH-shift Messung im Temperaturbereich bis  $-30^{\circ}\text{C}$  nachgewiesen werden (Abbildung III-19).

#### Abbildung III-19

*pH-shift von Interferon-Puffer und Natriumphosphatpuffer*



### 3.3.2. DSC-Messungen

Die eutektische Temperatur wird mittels Extrapolation der Peak-Onset-Temperatur durchgeführt [118].

#### 3.3.2.1. Ergebnisse

Zur Identifizierung der zu erwartenden Peaks wurden sämtliche Bestandteile der Lösung (Pufferkomponenten, Protein) in verschiedenen Konzentrationen mittels DSC vermessen. Durch die abweichenden Intensitäten der Messsignale bei unterschiedlicher Konzentration ist eine eindeutige Zuordnung zur entsprechenden Komponente möglich. Einen Überblick gibt Tabelle III-11: Zur Überprüfung der Meßmethode wurden Reinstwasser und Natriumchloridlösung als Kontrolle vermessen, da hierfür Literaturwerte vorliegen.

**Tabelle III-11:**

*Probenübersicht*

Nr.	Bezeichnung	Gelöste Bestandteile	Konzentration(en)	pH-Wert
1	Reinstwasser			--
2	Natriumchloridlösung	NaCl	120 mM, 240 mM	--
3	Ammoniumacetatlösung	NH <sub>4</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25 mM, 50 mM	5.0
4	Bulkpuffer (proteinfrei)	NaCl	120 mM	5.0
		NH <sub>4</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25 mM	
5	Interferon alpha-2a in Reinstwasser	Interferon alpha-2a	1.5 mg/mL, 3 mg/mL, 6 mg/mL	--
6	Interferon alpha-2a in Natriumchloridlösung	Interferon alpha-2a	1.5 mg/mL	--
		NaCl	120 mM	
7	Interferon alpha-2a in Ammoniumacetat	Interferon alpha-2a	1.5 mg/mL	5.0
		NH <sub>4</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25 mM	
8	Interferon alpha-2a Bulklösung	Interferon alpha-2a	1.5 mg/mL	
		NaCl	120 mM	5.0
		NH <sub>4</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	25 mM	

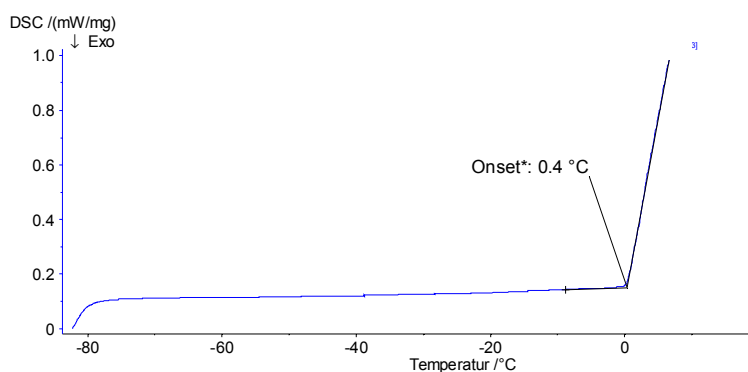
### 3.3.2.2. *Reinstwasser*

Die Auswertung mittels Onset-Bestimmung ergab für Wasser eine gute Wiederfindung des Schmelzpunktes von  $+0.4^{\circ}\text{C}$  (Abbildung III-20). Auf eine Kompensation des herrschenden Luftdruckes zum Zeitpunkt der Messung gegenüber dem Normalluftdruck (1013 mbar) wurde verzichtet, da die Schmelzpunktveränderungen durch Einflüsse des herrschenden Luftdruckes innerhalb der Genauigkeit der Meßmethode liegen. Die Bestimmung des Gefrierpunkts der Lösung ist mittels DSC weniger genau als die des eutektischen Punktes [118].

Im Temperaturbereich von  $-70^{\circ}\text{C}$  bis  $0^{\circ}\text{C}$  sind keine Peaks erkennbar, die auf exo- oder endotherme Reaktionen hinweisen.

**Abbildung III-20**

*DSC- Messsignal von Reinstwasser 50 $\mu\text{L}$*



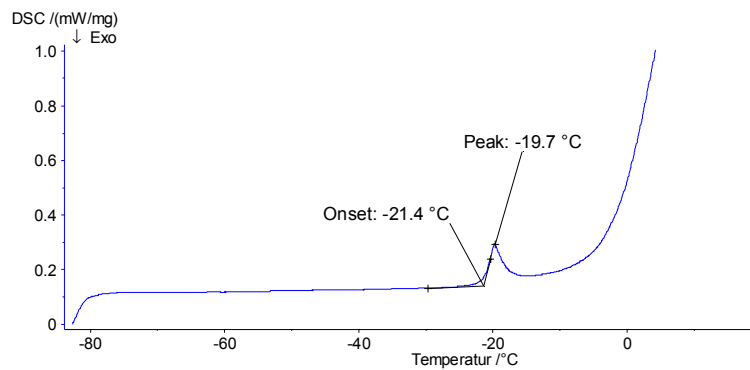
### 3.3.2.3. *Natriumchloridlösung 120 mM und 240 mM*

Für wässrige Natriumchloridlösungen ist in der Literatur der Wert für den eutektischen Punkt bei  $-21.3^{\circ}\text{C}$  beschrieben [115-116]. Zwei Lösungen mit unterschiedlicher Natriumchloridkonzentration wurden vermessen. Die Ergebnisse zeigen, dass der eutektische Punkt mittels der Onset-Auswertung in beiden Fällen sehr präzise bestimmt werden konnte. Die Erhöhung der Salzkonzentration hat erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Lage des eutektischen Punktes (Abbildung III-21 und Abbildung III-22). Die Peakhöhe korrelierte mit der Salzkonzentration, da zum Zeitpunkt des Durchschreitens des eutektischen Punktes bei höherer Salzkonzentration größere Mengen an flüssiger Salzlösung gebildet werden. Eine größere Menge an Energie ist für die endotherme Reaktion notwendig.

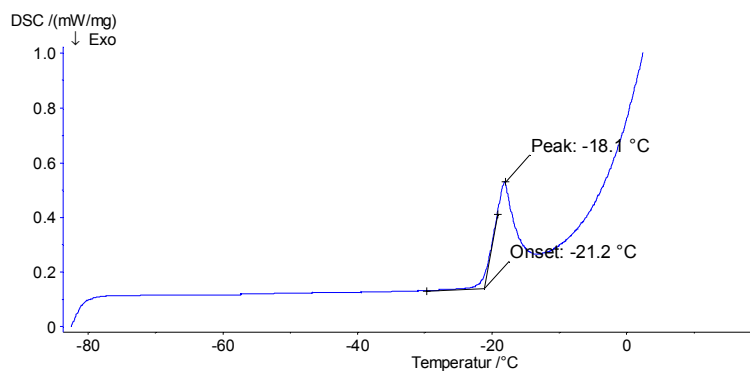


**Abbildung III-21**

*DSC- Messsignal von 0.12 mM Natriumchloridlösung*

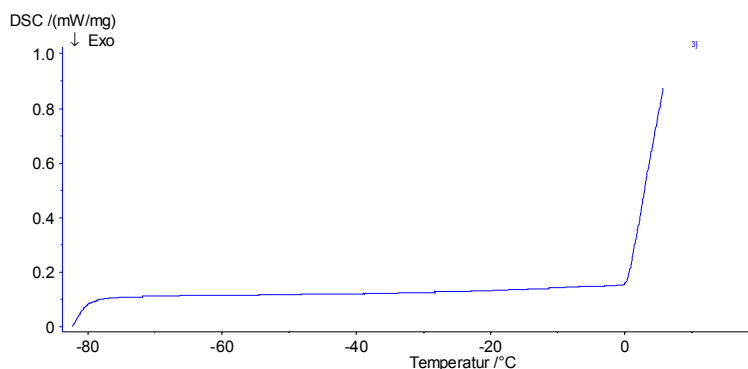
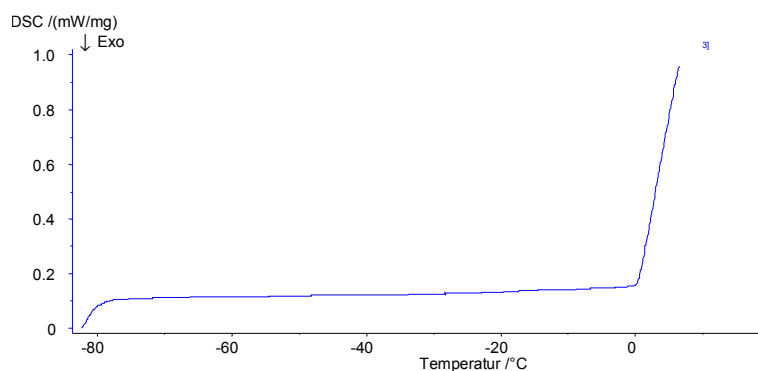
**Abbildung III-22**

*DSC- Messsignal von 0.24 mM Natriumchloridlösung*



#### 3.3.2.4. Ammoniumacetatlösung 25 mM und 50 mM

Für wässrige Ammoniumacetatlösungen konnten in der Literatur keine Hinweise auf die Ausbildung eines eutektischen Gemisches gefunden werden. Um diese Datenlage zu überprüfen wurde eine Lösung mit 25 mM Ammoniumacetat pH 5.0 vermessen. Wie aus Abbildung III-23 erkennbar, konnten keine signifikanten Peaks unterhalb des Gefrierpunktes nahe 0 °C detektiert werden. Zur Verifizierung wurde die Messung bei erhöhter Salzkonzentration (50 mM) wiederholt (Abbildung III-24).

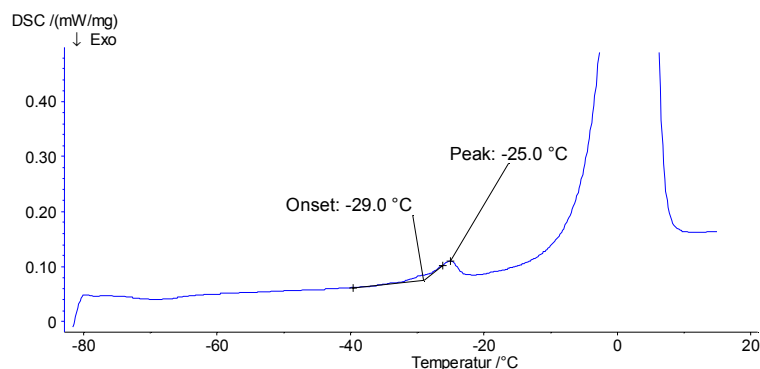
**Abbildung III-23***DSC- Messsignal von 25 mM Ammoniumacetatlösung, pH=5.0***Abbildung III-24***DSC- Messsignal von 500 mM Ammoniumacetatlösung, pH=5.0***3.3.2.5. Bulkpuffer (proteinfrei)**

Der Interferon alpha-2a Bulkwirkstoff ist in einem Puffermedium aus 120 mM NaCl und 25 mM Ammoniumacetat bei einem pH von 5.0 gelöst. Dieses Puffermedium wurde unter gleichen Bedingungen wie zuvor die einzelnen Salze vermessen. Wie aus Abbildung III-25 ersichtlich, war kein Peak bei  $-21.3^{\circ}\text{C}$  (Natriumchlorid) erkennbar. Stattdessen konnte eine endotherme Reaktion bei einer Temperatur von  $-29^{\circ}\text{C}$  beobachtet werden. Somit zeigt ein Gemisch aus Natriumchlorid und Ammoniumacetat einen um ca.  $-7.7^{\circ}\text{C}$  verschobenen eutektischen Punkt. Dies ist erstaunlich, da bei der Messung der Einzelkomponenten nur für NaCl ein Eutektikum detektiert werden konnte. Eine genauere Charakterisierung des thermodynamischen Prozesse ist aufgrund der komplexen Stoffzusammensetzung und der vorliegenden Daten nicht möglich.

Im Temperaturbereich von  $-70^{\circ}\text{C}$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  können keine signifikanten thermodynamischen Prozesse detektiert werden.

**Abbildung III-25**

*DSC-Messsignal von 120 mM Natriumchlorid, 25 mM Ammoniumacetatlösung bei pH=5.0*

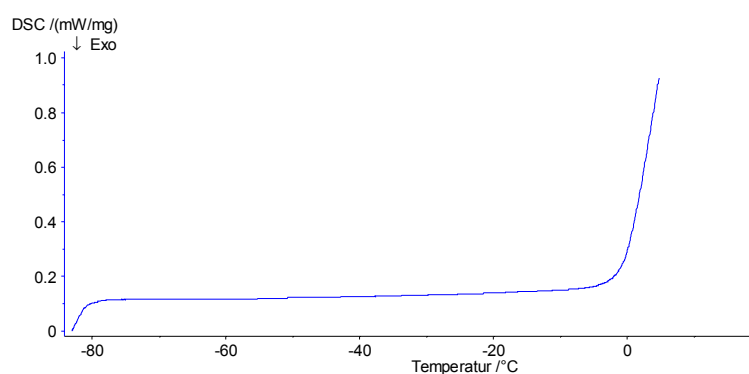


*3.3.2.6. Interferon alpha-2a in Reinstwasser*

Wässrige Proteinlösungen zeigen im gefrorenen Zustand zwei Glasübergänge [116]:  $T_g''$  (bei ca.  $-80^{\circ}\text{C}$ ) und  $T_g'$  (bei  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Die Proteinkonzentration in der Bulkwirkstofflösung ist mit 1.5 mg/mL Interferon jedoch so gering, dass in den DSC Messungen keine auswertbaren Signale erhalten werden können. Abbildung III-26 zeigt Interferon alpha-2a bei einer Konzentration von 1.5 mg/mL gelöst in Wasser. Selbst nach Erhöhung der Proteinkonzentration auf 3 mg/mL und 6 mg/mL können keine signifikanten Abweichungen zum Messsignal von Reinstwasser festgestellt werden (Abbildung III-27). Eine weitere Aufkonzentrierung des Proteins ist nicht möglich, da die Löslichkeit des relativ hydrophoben Interferons begrenzt ist.

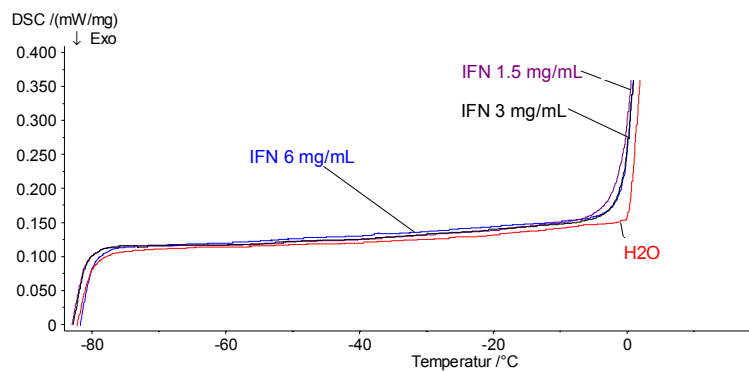
**Abbildung III-26**

*DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a (1.5 mg/mL) in Reinstwasser gelöst*



**Abbildung III-27**

Vergleich: Reinstwasser, Interferon alpha-2a in Konzentrationen von 1.5 mg/mL, 3 mg/mL und 6 mg/mL jeweils gelöst in Reinstwasser (vergrößerte Darstellung der y-Achse)

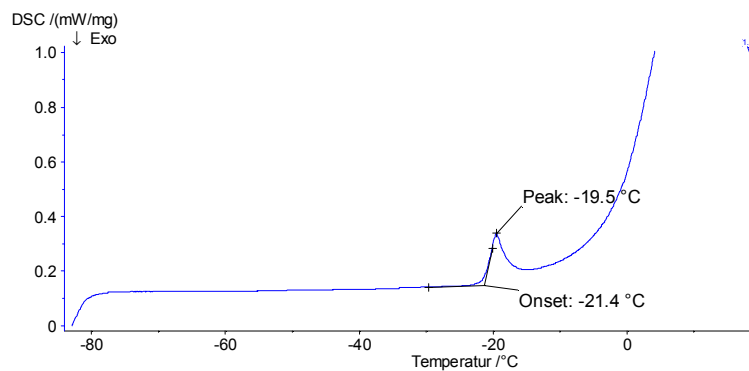


### 3.3.2.7. Interferon alpha-2a in Natriumchloridlösung

Zur Überprüfung, ob eine gegenseitige Beeinflussung von Protein und Natriumchlorid in Lösung besteht, wurde Interferon alpha-2a in Natriumchloridlösung von 0.12 und 0.24 mM umgepuffert und vermessen. Beide Messsignale zeigen nach qualitativer Auswertung keinerlei Abweichungen von der reinen Elektrolytlösung (vgl. Abbildung III-21, III-22 und III-28, III-29).

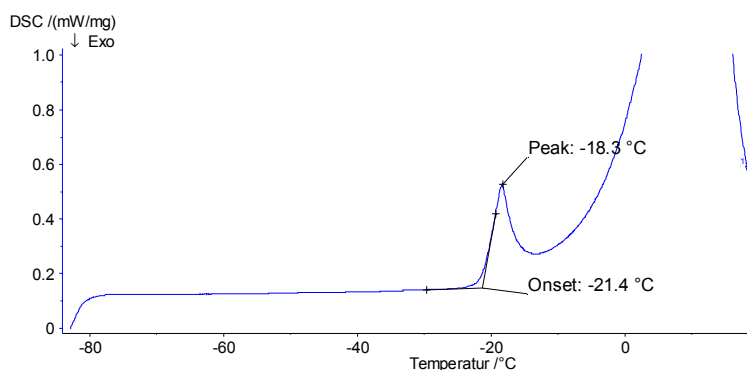
**Abbildung III-28**

DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a (1.5 mg/mL) in 120 mM NaCl-Lösung



**Abbildung III-29**

*DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a (1.5 mg/mL) in 0.24 mM NaCl-Lösung*

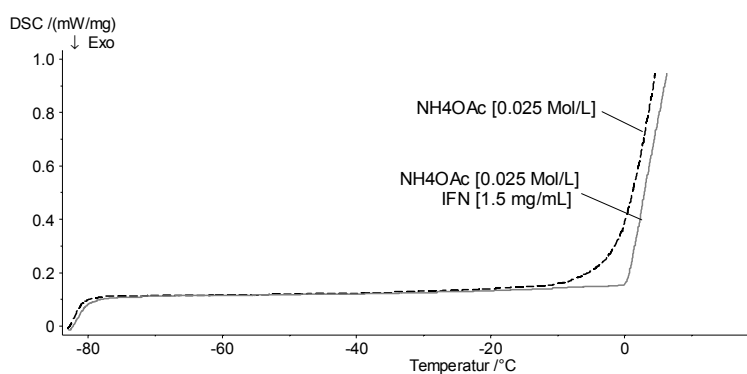


### 3.3.2.8. Interferon alpha-2a in Ammoniumacetatlösung

Auch der Vergleich der Ergebnisse von Ammoniumacetatlösung zu proteinhaltiger Pufferlösung (25 mM Ammoniumacetat, 1.5 mg/mL Interferon alpha-2a, **Abbildung III-30**) zeigt keinerlei Anhaltspunkte für relevante Änderungen der thermodynamischen Vorgänge im Bereich von  $-80^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$ .

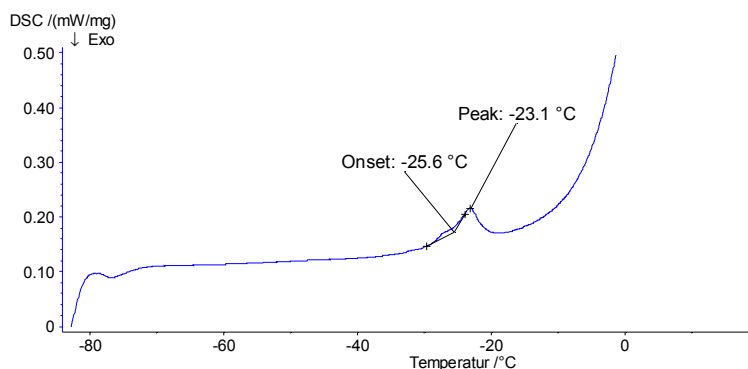
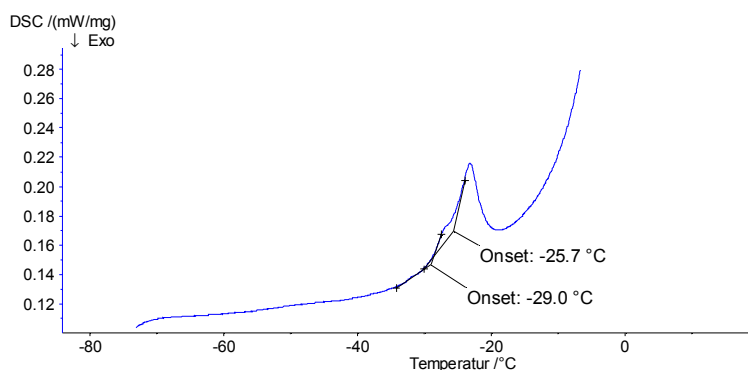
**Abbildung III-30**

*DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a (1.5 mg/mL) in 25 mM Ammoniumacetatlösung, pH 5.0 im Vergleich zu Ammoniumacetatlösung (25mM, pH 5.0)*



### 3.3.2.9. Interferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung

Die Interferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung zeigt ein dem reinen Bulkpuffer sehr ähnliches Messsignal (Abbildung III-31). Bei vergrößerter Darstellung zeigt der im Bereich zwischen  $-29^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$  erkennbare Peak eine Schulter (Abbildung III-32). Werden Hauptpeak und Schulter mittels Onset-Bestimmung ausgewertet, so ergeben sich zwei Werte bei  $-25,6^{\circ}\text{C}$  und  $-29^{\circ}\text{C}$ . Eine Zuordnung zu den Lösungsbestandteilen ist nicht möglich.

**Abbildung III-31***DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung***Abbildung III-32***DSC- Messsignal von Interferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung:**Onset 1: -25.7 °C**Onset 2: -29.0 °C***3.3.2.10. Zusammenfassung**

Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen können wie folgt zusammengefasst werden:

Im Bereich zwischen  $-70^{\circ}\text{C}$  und  $0^{\circ}\text{C}$  zeigt Reinstwasser keine Anzeichen für thermodynamische Phasenübergänge. Der Gefrierpunkt wird mit  $+0.4^{\circ}\text{C}$  für die Art der Messmethode hinlänglich genau gestimmt. Thermodynamische Prozesse wie die Bildung von Eutektika (Natriumchlorid) und somit Phasenübergänge im nicht optisch wahrnehmbaren Bereich werden mit der hier verwendeten DSC-Methode detektiert. Eine wässrige Lösung von Ammoniumacetat zeigt keine Anzeichen zur Ausbildung eines Eutektikums. Die Messmethode ist nicht für den Nachweis von Glasübergangstemperaturen des verwendeten Proteins in vorliegender Konzentration ( $1.5\text{ mg/mL}$  entspricht  $0.075\text{ mM}$ ) geeignet. Auch nach Erhöhung der Proteinkonzentration nahe der Löslichkeitsgrenze ist kein Glasübergang feststellbar. Die heterogene Elektrolytzusammensetzung der Bulkwirkstofflösung lässt keine

detaillierte Vorhersage über die thermodynamischen Prozesse zu. Die Anwesenheit von Natriumchlorid legt die Vermutung der Ausbildung eines Eutektikums nahe. Das thermodynamische Verhalten von Bulkpuffer Lösung (0.12 mM Natriumchlorid, 25 mM Ammoniumacetat, pH 5.0) unterscheidet sich signifikant von den Messergebnissen der Einzelkomponenten: Eine thermodynamische Zustandsänderung der Bulkpuffer Lösung ist bereits ab einer Temperatur von  $-29^{\circ}\text{C}$  zu erwarten. Im Bereich von  $-70^{\circ}\text{C}$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  ist keine thermodynamische Zustandsänderung der Pufferbestandteile nachweisbar. Die Einhaltung eines Sicherheitsbereiches von 5-10 K zur oberen Temperaturgrenze hin wird empfohlen, so dass die Lagertemperatur zu keinem Zeitpunkt  $-35^{\circ}\text{C}$  überschreiten sollte. Bulkpuffer und wirkstoffhaltige Bulkpuffer Lösung weisen bei einer Interferon alpha-2a Konzentration von 1.5 mg/mL keine signifikanten Unterschiede auf.

### 3.3.3. Schlussfolgerung

Eine Beeinträchtigung der Proteinstabilität durch pH-Wert Verschiebungen beim Einfrierprozess ist nicht zu erwarten. Bei Erhöhung der Lagertemperatur von Interferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung ist im Bereich von  $-70^{\circ}\text{C}$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  keine thermodynamischen Zustandsänderung der darin enthalten Pufferbestandteile nachweisbar. Aus Sicherheitsgründen sollte die Temperatur in der Bulkwirkstofflösung jedoch  $-35^{\circ}\text{C}$  nicht überschreiten. Erst bei Temperaturen von mehr als  $-30^{\circ}\text{C}$  ist die Ausbildung mikroskopisch kleiner, also optisch nicht erkennbarer flüssiger Anteile zu erwarten.

## 3.4. Zusammenfassung und Diskussion

Interferon Bulklösung zeigt nach dem Einfrieren und Auftauen in der KVS-Temperieranlage eine leichte, jedoch signifikante Präzipitation, die von ca. 2% des Interferongehalts verursacht werden. Bemerkenswerter Weise konnte mittels SE-HPLC keine Zunahme von aggregierten Spezies festgestellt werden. Da die Interferon Bulklösung bereits seit Jahren konventionell eingefroren wird und auch die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Interferon im CryoWedge<sup>TM</sup> (Kapitel III.6) keine Trübungserscheinungen dieses Ausmaßes aufweisen, ist der Grund für die Präzipitation im Scher- bzw. Oberflächeninduzierten Stress zu finden. Laborversuche zeigten die Anfälligkeit von Interferon zu Präzipitation infolge von Interaktionen mit der Gasphase und Scherstress. Hinzu kommt, dass während des Einfrierprozesses in den KVS-Temperieranlagen eine deutliche Aufkonzentrierung des Proteins zu verzeichnen ist, welche die Präzipitation mit verursachen könnte. Das Problem hängt zudem stark vom Beladungsvolumen der Edelstahlbehälter ab.

Das Beladungsvolumen der Edelstahlbehälter hat einen signifikanten Einfluss auf verschiedene Faktoren des Einfrierprozesses:

Zum einen wird die Prozesszeit deutlich erhöht. Jedoch zeigt Interferonlösung, die statisch, und somit noch deutlich langsamer eingefroren wird, keine Instabilitäten. Zum anderen wird der Scherstress insbesondere dadurch erhöht, dass über einen längeren Zeitraum während des Auftauens Eis vorhanden ist, das starke Turbulenzen verursachen kann. Der dritte Faktor sind die stärker ausgeprägten Cryokonzentrationseffekte. Wie das Beispiel des Scherstress zeigt, können diese Einflussfaktoren nicht getrennt voneinander betrachtet werden, da sie sich gegenseitig beeinflussen und bedingen.

Es ist möglich, einen Lösungsweg zur Vermeidung der Trübungseffekte aufzuzeigen. Die Präzipitation ist sehr stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Interferon als lipophiles Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 5.9 zeigt bereits bei Werten von pH 4.5 eine deutlich geringere Partikelbildung als bei pH 5.0.

Das Puffermedium zeigt keine pH-Wert Veränderungen während des Einfrierprozesses. Allerdings konnte ein Eutektikum der Natriumchlorid / Ammoniumacetat Puffers bei  $-29^{\circ}\text{C}$  nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird eine Lagerung der Proteinlösung unterhalb  $-30^{\circ}\text{C}$  empfohlen, um mögliche Abbaureaktionen zu vermeiden.



## 4. Stabilität von pegyliertem Interferon alfa-2a während Einfrier- und Auftauzyklen in KVS-Temperieranlagen

### 4.1. Einführung und Versuchsdurchführung

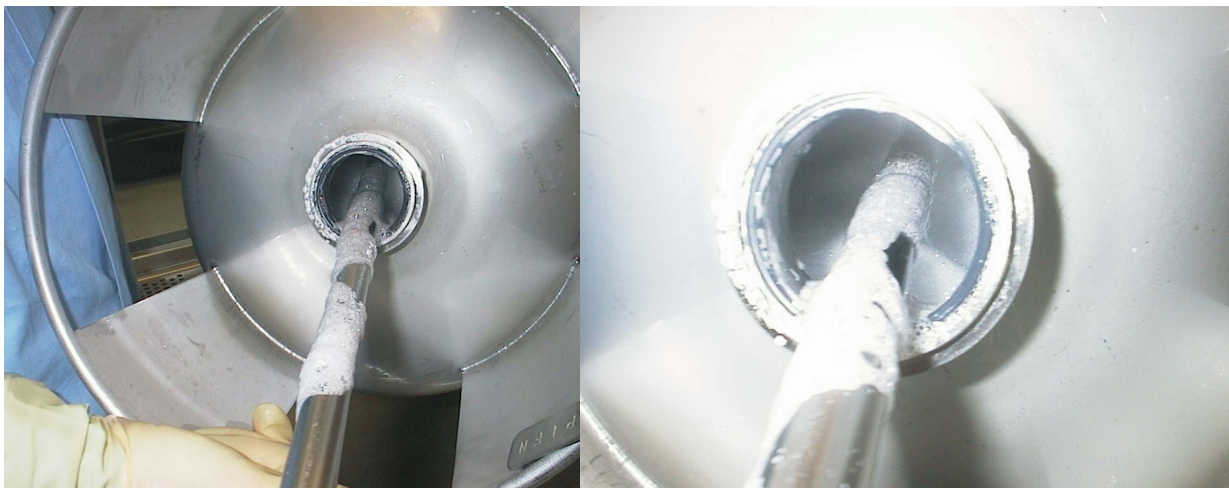
Die Stabilität von Peginterferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung wurde während wiederholter Einfrier- und Auftauzyklen in den Temperieranlagen der Fa. KVS GmbH, Marburg, untersucht. Hierzu wurden 14L Bulkwirkstofflösung in einen Edelstahlbehälter abgefüllt und die Stabilität während fünf Einfrierzyklen analysiert. Für die Versuchsreihe wurde Peginterferon alpha-2a Bulkwirkstofflösung mit einer Konzentration von 1.5 mg/mL verwendet. Die Lösung war zuvor bereits in 2 Edelstahlbehälter (EF1 und EF2) mit einem Befüllvolumen von je 7 L abgefüllt und in der KVS-Temperieranlage auf  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren worden. Bis zum Versuchsstart waren diese Behälter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Beide Edelstahlbehälter wurden in der KVS-Temperieranlage aufgetaut (Probe A1 EF1, und A1 EF2), filtriert ( $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ) und in einem neuen Edelstahlbehälter (A1 Mischprobe) für die nachfolgenden Versuche vereinigt. Die A1-Mischprobe wird als Ausgangswert für die folgenden Versuche bei maximalem Befüllvolumen gewertet. Die Probenahme ist in Tabelle III-12 nochmals aufgeführt.

Während der Versuchsdurchführung wurde festgestellt, dass der gesamte Luftraum des Behälters mit Schaum gefüllt war (**Abbildung III-33**). Aus diesem Grund wurde nach dem 4. Zyklus sowohl eine Probe aus der Produktlösung (Probe A4) als auch des Schaumüberstandes genommen (Probe: Schaumüberstand).

**Tabelle III-12***Probenübersicht*

Probenbezeichnung	Datum	Bemerkung
A1 EF1		Probe aus Edelstahlflasche EF1 nach Auftauen in KVS-Anlage (Volumen ~7L)
A1 EF2		Probe aus Edelstahlflasche EF2 nach Auftauen in KVS-Anlage (Volumen ~7L)
A1 Mischprobe		PEG-IFN aus EF1 und EF2 wurden filtriert (0.22 $\mu\text{m}$ ) und in einem neuen Edelstahlbehälter vereinigt. Ausgangsprobe für Stabilität Volumen = 14L.
A2		Nach 1. E/A-Zyklus
A3		Nach 3. E/A-Zyklus
A4		Nach 4. E/A-Zyklus
A5		Nach 5. E/A-Zyklus
Schaumüberstand		Probe des Schaumüberstandes nach 4. E/A-Zyklus

**Abbildung III-33***Deutliche Schaumbildung nach Einfrier- und Auftauzyklen in KVS- Rotationsbewegung*

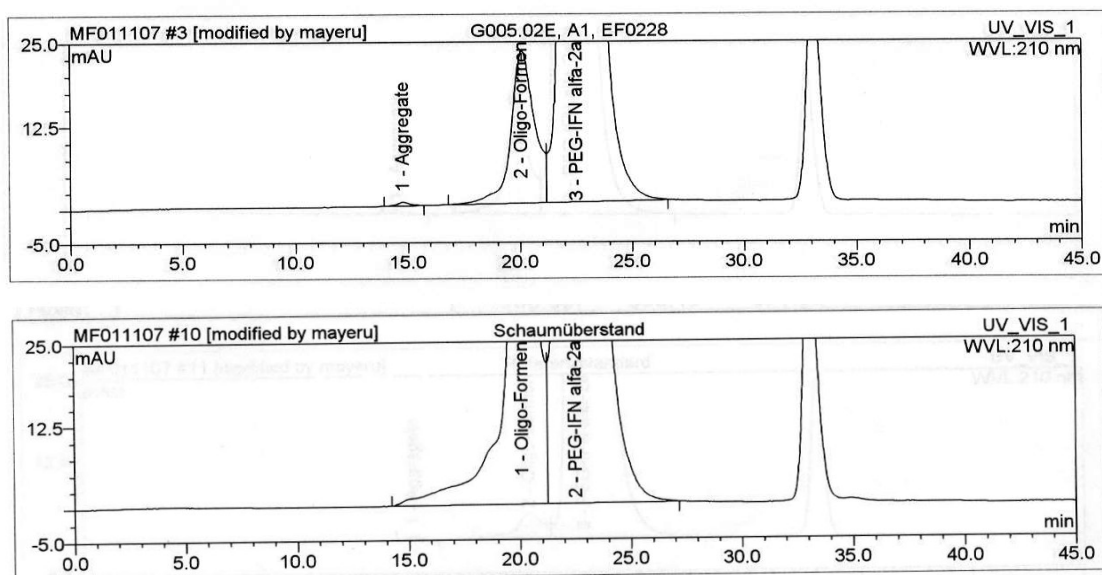
## 4.2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der SE-, RP-HPLC und Partikelmessung sind in **Tabelle III-13** zusammengefasst. Wie aus dem Vergleich der Analysenwerte der Proben A1 Mischprobe und A5 ersichtlich ist, können in der Produktlösung keine Anhaltspunkte für eine Aggregation (SE-HPLC) oder Präzipitation (Partikelmessung) von PEG-IFN gefunden werden. Die Ergebnisse der Partikelmessung weisen für die Probe A2 einen leichten Anstieg der Partikellast auf, bestätigt wurde diese Tendenz durch die nachfolgenden Werte jedoch nicht. Der Schaumüberstand konnte nach 30 Minuten unter Vakuumeinwirkung in eine wässrige Phase überführt und so mittels Lichtblockade vermessen werden.

Bei der Untersuchung des Schaumüberstandes zeigten sich jedoch Entmischungseffekte gegenüber der wässrigen Bulklösung. Während die wässrige Phase einen Anteil von weniger als 2 % Oligo-Peginterferon in der RP-HPLC aufweist, konnten im Schaumüberstand nahezu 3.5% des mehrfach pegylierten Interferon gefunden werden. Die Ergebnisse der SE-HPLC bestätigen diese Tendenz. Der Flächenanteil von Oligo-Peginterferon und Aggregaten ist im Schaum mit 8.3 % gegenüber dem wässrigen Produktanteil (4 %) erhöht. Eine quantitative Trennung der einzelnen Aggregatfraktionen und von Oligo-Peginterferon war nicht möglich (Abbildung III-34). Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration im Schaumanteil bei 280 nm nach Absetzen des Schaums mittels Zentrifugation ergab keine erhöhte Proteinkonzentration gegenüber der wässrigen Phase.

### Abbildung III-34

*SE-HPLC Chromatogramm von Peginterferon. Probe A5 (oben) und Probe des Schaumüberstandes (unten). Eine deutlich höherer Anteil an Aggregaten und Oligo-Formen sind im Schaumüberstand nachweisbar. Eine quantitative Trennung im Chromatogramm ist nicht mehr möglich*



**Tabelle III-13**

*Analysenergebnisse von Peginterferon alfa-2a während Einfrierzyklen in KVS-Temperieranlage*

Bezeichnung	SE-HPLC	
	Monomer-Peak [Flächen-%]	Oligo-Peg-IFN + Aggregate [Flächen-%]
Abfüllung	96.8	3.0
A1 EF1	96.0	4.0
A1 EF2	96.0	4.0
A1 Mischprobe	95.9	4.1
A2	96.0	4.0
A3	96.0	4.0
A4	95.9	4.1
A5	95.9	4.1
Schaumüberstand	91.7	8.3

Bezeichnung	RP-HPLC	
	Monomer-Peak [Flächen-%]	Oligo-Peg-IFN [Flächen-%]
Abfüllung	97.90	2.1
A1 EF1	97.97	2.03
A1 EF2	98.08	1.92
A1 Mischprobe	98.67	1.33
A2	98.24	1.76
A3	98.93	1.17
A4	98.42	1.58
A5	98.02	1.98
Schaumüberstand	96.56	3.44

Bezeichnung	Anzahl Partikel je mL		
	>1 µm	> 10 µm	> 25 µm
Abfüllung	<i>Keine Probenahme</i>		
A1 EF1	5422	176	57
A1 EF2	5725	139	43
A1 Mischprobe	1971	46	9
A2	7915	676	32
A3	1954	96	0
A4	1399	42	1
A5	4806	47	14
Schaumüberstand	3994	90	4

Ein Grund für die erhöhten Werte für Oligo-Peginterferon im Schaumanteil könnte in der erhöhten Oberflächenaktivität des mehrfach pegylierten Interferons gegenüber mono-Peginterferon liegen. Es zeigt möglicherweise eine höhere Schaumbildungstendenz und wird somit in der Schaumphase angereichert.

Versucht man die unterschiedliche Hydrophilie mit Hilfe der HLB-Werte von mono-Peginterferon und di-Peginterferon auf Basis eines extrem vereinfachten Systems zu charakterisieren, so kommt man zu dem Ergebnis, dass der HLB-Wert von di-Peginterferon deutlich höher ist. Hierzu wird der Interferon-Rest als hydrophober und der PEG-Rest als hydrophiler Molekülanteil gewertet. Allerdings muss man sich hierbei bewusst sein, dass ein gefaltetes natives Protein sicherlich nicht mit einem Alkanrest vergleichbar ist. Interferon ist zwar ein relativ lipophiles Molekül mit immerhin mäßiger Wasserlöslichkeit. Jedoch auch diese Überlegung bestätigt die unterschiedliche Hydrophilie von mono- und di-Peginterferon. Die Schaumbildung selbst ist ein Hinweis auf physikalische Stressfaktoren während des Einfrier-Auftauvorgangs. Es scheint, dass die Interaktionsfläche zwischen Gas- und Flüssigphase stark vergrößert wird. Dies könnte auch der Grund für den Anstieg des aggregierten Proteinanteils sein.

#### 4.2.1.1. *Quantifizierung des Schaumanteils*

Die Menge an gebildetem Schaum wurde grob quantifiziert. Hierzu wurde die wässrige Bulklösung vom Schaumanteil durch Dekantieren des Edelstahlbehälters getrennt. Der Schaumanteil betrug weniger als 100 g. Bei einem Gesamtvolumen von 14L Bulklösung betrug der Schaumanteil somit weniger als 0.7 % (m/m).

#### 4.2.1.2. *Ermittlung des Grundes der Schaumbildung*

Zur Ermittlung der Ursache für die Schaumbildung wurden weitere Versuche durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Rotationsbewegung in der KVS-Anlage bei 5°C ohne Einfriervorgang zu keiner Schaumbildung führte. Die Ursache war also im Einfrier- und / oder Auftauvorgang zu suchen.

Deshalb wurde ein weiterer Edelstahlbehälter mit Peginterferon Bulklösung in der KVS-Anlage auf -80°C tiefgefroren und anschließend statisch, also nicht in der KVS-Anlage, im Kühlraum aufgetaut. Die Schaumbildung konnte hierdurch vermieden werden. Es war lediglich eine sehr dünne Schaumschicht (< 1 cm) zu erkennen (Abbildung III-35). Der Grund für die Schaumbildung war also im Auftauprozess in der KVS-Anlage zu suchen.

Es ist anzunehmen, dass während des Auftauvorganges der Eiszylinder partiell schmilzt und sich vom Behälterrand löst. Dadurch bildet der Eiszylinder oder Fragmente des Eiszylinders ein mechanisches Hindernis in dem sich oszillierend drehenden Edelstahlbehälter. Die Folge sind Scherstress und Interaktionen der Proteinlösung mit dem Headspace, die zur Schaumbildung des Proteins führen.

**Abbildung III-35**

*Geringe Schaumbildung nach statischem Auftauen*



#### 4.3. Zusammenfassung und Diskussion

Die Peginterferon Bulklösung zeigt, mit Ausnahme des sich ausbildenden Schaumüberstandes, eine hohe Stabilität während wiederholter Einfrierzyklen in der KVS-Temperieranlage. Der Grund für die Schaumbildung ist der Auftauvorgang in der KVS-Anlage unter Rotationsbewegung: Es kommt zu starken Oberflächeninteraktionen zwischen der wässrigen Produktlösung und der Gasphase. Diese wird durch die Rotationsbewegung in Anwesenheit des zum Teil noch gefrorenen Eiszylinders verursacht. Die Schaumbildung ist aufgrund der darin stattfindenden Anreicherung von Oligo-Peginterferon und Aggregaten als kritisch einzustufen. In der Bulklösung (wässrige Phase) ist keine Zunahme von mehrfach pegyliertem Interferon sowie Aggregaten nachweisbar. Es konnte nicht geklärt werden, ob es lediglich zu einer Anreicherung von Aggregaten oder zur Neubildung und Ansammlung von Aggregaten im Schaum kommt.

Die entstehende Menge an Schaum ist mit weniger als 0.7 % der Gesamtmenge an Bulklösung gering. Unter Berücksichtigung dieser Schaummenge am Gesamtanteil des Proteins ist die Zunahme der Aggregate mit weniger als 0.02 % als unerheblich anzusehen.

Nach mehrfacher Teilentnahme von Produkt aus dem Behälter und zwischenzeitlicher Lagerung kann es jedoch zu einem Anstieg der Oligo-PEG-IFN und aggregierten Produktanteilen während der letzten Produktentnahme kommen. Für diesen Fall wäre die Chargenhomogenität in Frage zu stellen. Von der Verwendung der KVS-Temperieranlage zum Auftauen von Peginterferon alfa-2a Bulkwirkstofflösung wird abgeraten. Eine Vermeidung der Schaumbildung ohne weitreichende Eingriffe in die Art des Auftauprozesses ist nicht möglich. Das Einfrieren in der KVS-Anlage ist jedoch problemlos möglich, falls statisch aufgetaut wird.

## 5. Untersuchungen an Trastuzumab Bulklösung

Die Stabilität der Trastuzumab (MAK <HER2>) Antikörperlösung sollte in der KVS Temperieranlage überprüft werden. Hierzu wurden Vorversuche und anschließend eine Optimierung des Prozesses an den KVS-Temperieranlagen durchgeführt.

### 5.1. Stabilität von Trastuzumab Bulklösung während wiederholter Einfrier-Auftauzyklen: Langsames Einfrieren auf $-36^{\circ}\text{C}$

#### 5.1.1. *Einleitung und Versuchsdurchführung*

Die Trastuzumab Bulklösung wurde bisher in großvolumigen Edelstahlcontainern auf eine Lagertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Behälterdesign ähnelt dem der Integrated Biosystems CryoVessel<sup>TM</sup> insofern, als dass die Behälter mit einem doppelwandigem Kühlmantel und Kühlrippen im Inneren ausgestattet sind. Die Anordnung der Kühlrippen ist unterschiedlich. Kühlaggregat und Steuerungstechnik sind nahezu identisch mit den Integrated Biosystems Systemen.

Um zu überprüfen, ob die KVS-Temperieranlage grundsätzlich dazu geeignet ist, Trastuzumab-Bulk einzufrieren, wurde zuerst versucht, das Temperatur-Zeit-Profil des Produkts in den Großbehältern auf das KVS-System zu übertragen. Hierzu wurden Behälter mit Puffer gefüllt und mit Temperaturfühlern ausgestattet und auf  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Eine kurzfristige Produktabkühlung auf Temperaturen von bis zu  $-45^{\circ}\text{C}$  war zulässig, da auch im bisherigen System ein ähnlicher Temperaturverlauf erreicht wurde. Es zeigte sich, dass bei Minimalbeladung mit einem Behälter mit 4L Bulkpuffer eine Temperatur von bis zu  $-45^{\circ}\text{C}$ , bei Maximalbeladung mit 8 Behältern je 15L von bis zu  $-36^{\circ}\text{C}$  erreicht wird. In Anlehnung an die Vorgaben des bisherigen Einfrierprozesses wurde eine mindestens 8-stündige Lagerung bei Temperaturen tiefer als  $-35^{\circ}\text{C}$  vorgegeben.

**Tabelle III-14**

*Einfrierprofil für Trastuzumab: Überschwingen auf  $-36^{\circ}\text{C}$  und Lagerung bei  $-25^{\circ}\text{C}$*

<b>Einfrierrezept für Trastuzumab Zieltemperatur <math>-36^{\circ}\text{C}</math></b>			
Nr.:	Schrittbezeichnung	Schrittzeit [hh:mm]	Schritt-Temp. [ $^{\circ}\text{C}$ ]
1	Beladen	00:01	+20
2	Einfrieren	00:15	-55
3	Einfrieren	01:00	-55
4	Einfrieren	02:30	-42
5	Einfrieren	08:30	-42
6	Einfrieren	00:15	-25
7	Lagern	00:01	-25
<b>Einstellung der maximalen Umlufttemperatur</b>			
Heizen: $+40^{\circ}\text{C}$		Kühlen $-150^{\circ}\text{C}$	

Der Auftauprozess wurde zu Beginn mit einer Vorlauftemperatur von  $+35^{\circ}\text{C}$ , anschließend bei  $+5^{\circ}$  durchgeführt. Somit konnte eine Produkterwärmung auf maximal  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  erzielt werden. Eine Schädigung des Proteins durch Wärmeeinwirkung konnte somit ausgeschlossen werden. Zuerst wurde die Stabilität von Trastuzumab-Bulk während wiederholter Einfrier-Auftauzyklen mit einer Zieltemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  überprüft. Hierzu wurde ein Behälter mit einem Befüllvolumen von 5L Bulklösung mehreren Einfrier-Auftauzyklen unterworfen. Die Stabilität des Proteins wurde mittels SE-HPLC, Partikelmessung und SDS-PAGE überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle III-15 zusammengefasst.

#### 5.1.2. Ergebnisse

Nach 5 Einfrier-Auftauzyklen in der KVS-Anlage konnten keine Anzeichen für eine chemische oder physikalische Instabilität des Antikörpers festgestellt werden. Allerdings war die notwendige Prozesszeit mit 11 Stunden sehr lange. Da die KVS-Temperieranlage eine sehr viel höhere Kühlleistung als gewöhnliche Cryostaten besitzt, sollte versucht werden, die Einfriergeschwindigkeit zu erhöhen. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, ob eine vorübergehende Abkühlung des Produktes auf bis zu  $-80^{\circ}\text{C}$  einen negativen Einfluss auf die Stabilität hat. Ziel war es, mit einem Einfrierrezept, das Zeitpunkt für andere Proteine bereits validiert war, auch den Trastuzumab-Bulk einzufrieren.



**Tabelle III-15**

*Stabilität von Trastuzumab-Bulk nach wiederholten Einfrier-Auftauzyklen in KVS-Temperieranlage mit Einfrierrezept Nr. 1*

	Behälter mit 5L Trastuzumab Bulk				Referenz-Behälter mit Puffer (ohne Protein)	
Proben-Bezeichnung	SDS-PAGE	SEC-HPLC	Partikel		Partikel	
			> 10µm/mL	> 25µm/mL	> 10µm/mL	> 25µm/mL
Ausgangswert nach Abfüllung	Keine Veränderung	99,84	1	0	3	0
1. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	43	3	380	11
2. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	42	2	31	11
3. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	40	2	31	2
4. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	41	1	32	11
5. Zyklus	Keine Veränderung	99,82	25	1	8	0

## 5.2. Stabilität von Trastuzumab Bulklösung während wiederholter Einfrier-Auftauzyklen: Schnelles Einfrieren auf $-75^{\circ}\text{C}$ bei verschiedenen Befüllvolumina

### 5.2.1. Einleitung und Versuchsdurchführung

Aus diesem Grund wurde eine neue Versuchsreihe mit einem Einfrierrezept ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) gestartet. Die sehr kurze Prozesszeit von nur 3 Stunden bis zum Erreichen von  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$  erlaubt einen hohen Volumendurchsatz. Daher wurde die Stabilität von Trastuzumab-Bulk beim Einfrieren im KVS-System auf Temperaturen von  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$  und anschließender Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  überprüft.

Ziel der Versuchreihe war es, festzustellen, ob der MAK <HER2>-Bulkwirkstoff

- **während wiederholter Einfrier- und Auftauvorgänge in den KVS-Temperieranlagen**

und

- **anschließend während der Lagerung (28 Tage) in Edelstahlcontainern bei +5°C**

hinsichtlich aller Qualitätskriterien beständig war. Durch die unterschiedlichen Befüllvolumina sollten mögliche stabilitätsbeeinflussende Faktoren ermittelt werden, die durch die verlängerte Prozesszeiten und die verstärkten Cryokonzentrationseffekte auftreten. Verwendet wurden drei Edelstahlbehälter mit Befüllvolumina von 4L, 10L und 15L Produktlösung (Tabelle III-16).

Die anschließende Lagerung bei 5°C dient der Ermittlung von Instabilitäten, die erst durch Alterungseffekte auftreten würden. Die Proben wurden mittels SE-HPLC, SDS-PAGE, HIC-HPLC und Partikelmessung untersucht. Die drei Edelstahlbehälter mit MAK <HER2>-Wirkstoff wurden in der KVS-Anlage auf -80°C eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Nach dem Einfrieren auf -75°C war eine langsame Produkterwärmung auf -20°C für mehrere Stunden vorgesehen. Erst dann startete das Auftaurezept selbstständig.

Hintergrund dieser Lagerphase war die Durchschreitung von  $T_g'$  von Trehalose (-35 bis -40°C, Kapitel III.7.4). Ein Hinweis auf die Existenz eines eutektischen Punktes des Histidin-HCl Puffers war nach eingehender Literaturrecherche nicht zu finden. Beides könnte eine Auswirkung auf die Proteinstabilität haben. Allerdings spielen diese Faktoren während der Lyophilisation ( $T_g'$ ) oder längeren Lagerung bei -20°C und weniger bei Einfrier-Auftaustabilitäten eine Rolle.

Die Zyklen wurden mit Hilfe eines einzigen automatisierten Rezeptes durchgeführt.

**Tabelle III-16***Überblick: Bestimmung der Stabilität von Trastuzumab-Bulk*

Bezeichnung	Inhalt	Volumen	Bemerkung
Container A	MAK <HER2>-Bulk	4L	Minimalbefüllung
Container B	MAK <HER2>-Bulk	10L	
Container C	MAK <HER2>-Bulk	15L	Maximalbefüllung
Referenz zu Container A	Pufferlösung ohne Protein	5L	Referenzbehälter für Partikelmessung
Referenz zu Container B+C	Pufferlösung ohne Protein	15L	Referenzbehälter für Partikelmessung

Als Referenzbehälter (Negativkontrolle, Blindwert) für die Partikelbestimmung wurde je ein mit 5 und 15L Bulkpuffer (ohne Protein) gefüllter Edelstahlbehälter mit Container A bzw. C gleichbehandelt. Sämtliche Edelstahlbehälter wurden entsprechend den gültigen SOP's gereinigt und autoklaviert. Die Bulk- und Proteinlösung wurden bei der Abfüllung filtriert (0.2 µm). Hierdurch konnte Partikelfreiheit gewährleistet werden. Während sämtlicher Prozessschritte wurde eine Erwärmung auf Temperaturen größer 17°C vermieden. Hierzu mussten die drei Container in jeweils getrennten Arbeitsschritten aufgetaut werden. Nach jedem Einfrier-Auftauzyklus wurden Proben unter der Laminar-Flow-Box gezogen.

#### 5.2.2. Ergebnisse

Es wurden keine Anzeichen für Instabilitäten gefunden. Der Antikörper war nach wiederholten Einfrier-Auftauzyklen und auch nach der anschließenden Lagerung bei +5°C hinsichtlich aller Kriterien stabil. Die Anzahl der gebildeten Partikel im Bulk war nur geringfügig und deutlich unterhalb der Grenzwert der USP XXIV für Parenteralia.

Einen Überblick zu Art und Umfang der Versuche sowie Ergebnisse geben die Ergebnistabellen III-17 bis III-19.

Darüber hinaus wurde auch der Histidinhydrochlorid Puffer mittels pH-shift Messung bis -20°C charakterisiert. Es zeigte sich, dass der Bulkpuffer nur eine sehr geringe pH-Wert

Verschiebung um 0.5 pH Einheiten aufweist, die auf die Stabilität des Proteins keinen Einfluss haben sollte.

Abbildung III-36

*pH-shift Messung von Histidin-HCl Puffer (pH 6.0 bei +20°C)*

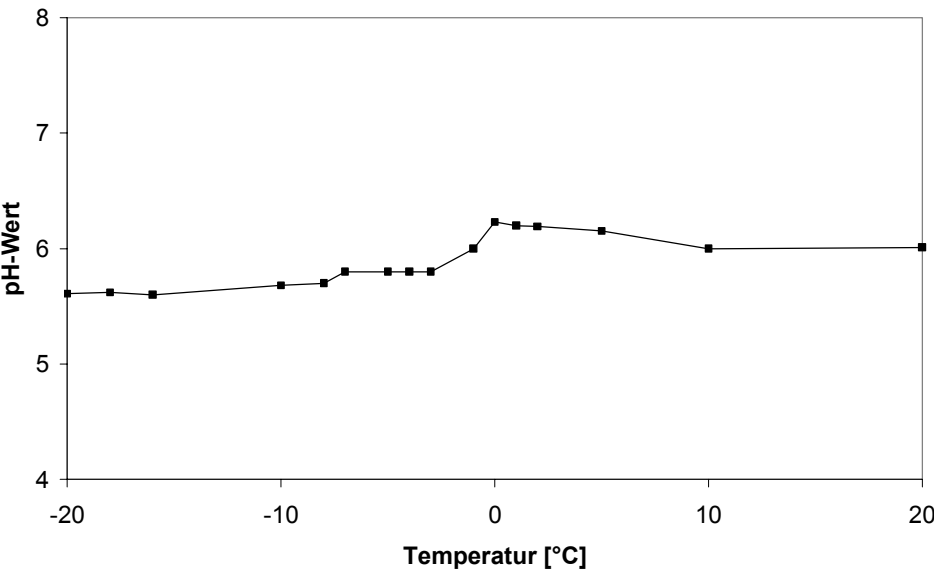


Tabelle III-17 :

*Stabilität von MAK <HER2> in während Einfrier-Auftauzyklen in KVS-Anlage – Container A (Bulkvolumen 5L)*

Container A (Bulkvolumen 5L)				
Probe-Bezeichnung	SDS-PAGE	SEC-HPLC	Partikel	
			> 10µm/mL	> 25µm/mL
Ausgangswert nach Abfüllung	unauffällig	99,84	23	2
1. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	21	1
2. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	14	1
3. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	13	0
4. Zyklus	Keine Veränderung	99,83	17	1
5. Zyklus	Keine Veränderung	99,82	29	3

**Tabelle III-18**

*Stabilität von MAK <HER2> in während Einfrier-Auftauzyklen in KVS-Anlage – Container B  
(Bulkvolumen 10L)*

Proben-Bezeichnung	Container B (Bulkvolumen 10L)			
	SEC-HPLC	HIEC-HPLC	Partikel	
	Hauptpeak [Flächen-%]	Hauptpeak [Flächen-%]	> 10 µm/mL	> 25 µm/mL
Ausgangswert nach Abfüllung	99,75	68,8	n. a.	n. a.
1. Zyklus	99,77	67,70	11	1
2. Zyklus	99,79	68,23	12	1
3. Zyklus	99,73	67,79	4	0
4. Zyklus	99,79	68,26	14	0
5. Zyklus	99,77	68,65	261	1
Standzeit 7 Tage	99,79	68,21	35	0
Standzeit 14 Tage	99,82	67,91	178	0
Standzeit 21 Tage	99,83	67,78	164	2
Standzeit 28 Tage	99,78	67,98	169	1

**Tabelle III-19**

*Stabilität von MAK <HER2> in während Einfrier-Auftauzyklen in KVS-Anlage – Container C  
(Bulkvolumen 15L)*

Proben-Bezeichnung	Container C (Bulkvolumen 15L)			
	SEC-HPLC Hauptpeak [Flächen-%]	HIEC-HPLC Hauptpeak [Flächen-%]	Partikel	
			> 10 µm/mL	> 25 µm/mL
Ausgangswert nach Abfüllung	99,66	65,9	n. a.	n. a.
1. Zyklus	99,72	63,52	25	1
2. Zyklus	99,73	64,56	24	1
3. Zyklus	99,65	64,51	21	0
4. Zyklus	99,71	64,81	15	0
5. Zyklus	99,66	64,64	85	0
Standzeit 7 Tage	99,71	64,45	26	1
Standzeit 14 Tage	99,73	64,79	156	2
Standzeit 21 Tage	99,74	64,03	139	1
Standzeit 28 Tage	99,68	63,49	148	1

### 5.3. Zusammenfassung

Der monoklonale Antikörper Trastuzumab zeigt in der vorliegenden Formulierung mit 0.02% (m/V) Polysorbat 20 und 60 mM/L Trehalose während wiederholter Einfrier- und Auftauzyklen in der KVS-Temperieranlage keinerlei Instabilität. Es sind keine Hinweise auf eine Aggregation oder Präzipitation zu erkennen. Ein bedeutender Grund hierfür dürfte in der gewählten Formulierung zu suchen sein. Carpenter et al. (University of Colorado, Boulder) waren an der Entwicklung dieser Proteinlösung maßgeblich beteiligt und konnten ein reziprokes Verhältnis zwischen der Tendenz des Antiköpers zur Aggregation und dem Zusatz von Disacchariden während Lyophilisationsprozessen aufzeigen [126]. Es ist festzuhalten, dass kein Effekt der unterschiedlichen Befüllvolumina auf die Stabilität des Proteins feststellbar war. Weder die zu erwartenden höheren Cryokonzentrationseffekte noch die erhöhten Scherkräfte hatten einen Einfluss.

Die Versuche mit Trastuzumab Bulklösung wurden aufgrund der hervorragenden Stabilität des Proteins nicht weiter geführt.

## 6. Stabilitätsuntersuchungen im Integrated Biosystems CryoWedge™

### 6.1. Ergebnisse

Um vergleichende Datensätze der bisher untersuchten Protein Bulklösungen in einem konventionellen, also statischen Einfriersystem zu erhalten, wurde die Stabilität von Interferon alfa-2a, Peginterferon alfa-2a und Trastuzumab während fünf Einfrierzyklen im CryoWedge™ ermittelt. Als Einfrierprogramm wurde das vom Hersteller empfohlene Standardeinfrierprogramm gewählt (Kapitel II.2.1.1). Während des Auftauens wurden die für das jeweilige Protein festgelegten maximalen Produkttemperaturen nicht überschritten. Der Kühlmittelsollwert wurde auf die in Tabelle III-20 angegebenen Werte begrenzt. Es zeigte sich, dass sämtliche Proteine keine nennenswerten Degradation oder Aggregate aufwiesen. Lediglich Interferon alfa-2a wies eine geringfügige Präzipitationstendenz auf. Jedoch lagen die gemessenen Partikelwerte selbst nach fünf Einfrierzyklen weit unterhalb der Versuche in der Messwerte, die nach 1 Zyklus KVS-Anlage ermittelt wurde. Tabelle III-20 gibt einen kurzen Überblick über die Ergebnisse.

### 6.2. Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass selbst nach fünf Einfrierzyklen im 20 Zoll CryoWedge™ mit keinen nennenswerten Produktverlusten zu rechnen ist. Allerdings zeigten diese Produkte beim konventionellen Einfrieren in Kunststoffflaschen bisher auch keine nennenswerten Instabilitäten. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit den vorliegenden Proteinen nicht weitergeführt. Jedoch sei auf das Kapitel III.7.6 verwiesen. Die dort vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch durch die Verwendung des CryoWedge™ keine Stabilisierung erreicht werden kann, falls die Formulierung für die Stabilität des Produktes ungeeignete Eigenschaften aufweist.



**Tabelle III-20**

*Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung im 20-Zoll CryoWedge™*

	max. Produkttemp. [°C]	Monomer [Flächen-%] SE-HPLC	SDS-PAGE	Anzahl Partikel je mL > 10 µm      > 25 µm	
Interferon alfa-2a	Ausgangswert	99.8	Entspricht	256	15
	3. Zyklus	99.6	Entspricht	499	27
	5. Zyklus	99.8	Entspricht	1015	26
Peginterferon alfa-2a	Ausgangswert	96.8	Entspricht	107	7
	3. Zyklus	96.8	Entspricht	133	0
	5. Zyklus	96.7	Entspricht	86	16
Trastuzumab	Ausgangswert	99,84	Entspricht	7	1
	3. Zyklus	99,82	Entspricht	43	1
	5. Zyklus	99,84	Entspricht	59	3

## 7. Entwicklung einer stabilen Formulierung für das Einfrieren von Daclizumab Bulklösung

Der MAK <IL2-R-P55> (Daclizumab, Handelspräparat Zenapax<sup>®</sup>) liegt nach dem Aufreinigungsprozess in einer Pufferlösung bestehend aus 67 mmol/L Natriumphosphat und 78.7 mmol/L Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 6.9 vor. In dieser Pufferlösung (PBS-Puffer) zeigt der Antikörper nach einem Einfrier- und Auftauvorgang Qualitätsverluste in Form von Aggregaten. Ziel der Versuchsreihe war es, durch eine Veränderung der Pufferzusammensetzung bzw. eine Zugabe von Additiven eine Stabilisierung des Antikörpers zu erreichen.

Der zweite Teil der Versuchsreihe sah ein Scale Up des Prozesses in den Produktionsmaßstab vor: Die Stabilität der Bulkwirkstofflösung sollte während wiederholter Einfrier-Auftauzyklen in Temperieranlagen der Fa. KVS GmbH überprüft werden.

### 7.1. Versuchsplanung und -aufbau

Der Aufbau der Versuchsreihe war in 3 Teile gegliedert:

- 1) Bestimmung der Qualität und Quantität der Aggregation unter standardisierten Versuchsbedingungen
- 2) Ermittlung der Ursachen für die Instabilität des Antikörpers und Findung einer stabilen Formulierung
- 3) Scale up und Überprüfung der Stabilität unter Produktionsbedingungen

#### 7.1.1. *Einfrier- und Auftauversuche*

Aufgrund der großen Produktionsmengen und der damit benötigten großen Lagerkapazitäten wurde eine Lagertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  angestrebt. Sämtliche Versuche zur Ermittlung der Einfrierstabilität mit Ausnahme des Scale Up wurden deshalb in Gefrierschränken mit einer Lagertemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Als Versuchsgefäße dienten Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen mit einem Bruttovolumen von 15 mL. Das Befüllvolumen betrug zwischen 9 und 11 mL Bulklösung. Die Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen waren in einem Probengefäßständer (Kunststoff) mit einem Mindestabstand von 0.5 cm zwischen den Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen gelagert, um so einen ausreichenden Wärmeübergang auf das Gefriergut zu gewährleisten. Um sicher zu gehen, dass die Probenlösung zu Versuchsbeginn frei von Schwebeteilchen war, wurden sämtliche

Probenlösungen während der Abfüllung in die Falcon®-Röhrchen mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0.2 µm) steril filtriert.

Die Falcon®-Röhrchen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach 3 h waren diese vollständig aufgetaut und wurden in einen Kühlschrank (+5°C) bis zur Probenahme umgelagert. Es wurden jeweils 5 Einfrier- und Auftauzyklen durchgeführt und anschließend analysiert. Spätestens 48 h nach Abschluss des Auftauprozesses wurde die Auswertung der Proben durchgeführt.

#### 7.1.2. *Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung*

Der Natriumphosphatpuffer der Bulkformulierung zeigt während des Einfriervorgangs einen deutlichen pH-shift, der für Aggregation und Deamidierung verantwortlich sein kann [38]. Aus diesem Grund war es nahe liegend, die Stabilität des Antikörpers in einem anderen Puffersystem bei ähnlichem pH-Wert zu überprüfen. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, ob durch den Zusatz von cryoprotektiven Excipienten eine Stabilisierung im bisherigen Bulkpuffer erreicht werden kann.

#### 7.1.3. *Auswahl der cryoprotektiven Excipienten*

In der Literatur sind vielfältige Hinweise auf stabilisierende Excipienten während des Einfrier- und Lyophilisationsprozesses zu finden. Neben Kosolventien finden auch Zucker und nichtionische Tenside Verwendung. Bei der hier zu treffenden Auswahl spielte vor allem der Einfluss der Hilfsstoffe auf die bereits erteilte Zulassung des Präparates eine gewichtige Rolle. Polysorbat 80 ist in einer Konzentration von 0.02% bereits im Fertigarzneimittel enthalten und wird während der Endformulierung vor der Abfüllung zugegeben. Eine Zugabe von Polysorbat 80 direkt nach dem Aufreinigungsprozesses wäre somit ohne größeren Aufwand durchführbar. Die Konzentration von Polysorbat 80 sollte aus herstelltechnischen Gründen nicht die im Fertigarzneimittel enthaltenen 0.02 % (V/m) überschreiten, da bei der späteren Herstellung des Drug Products eine entsprechende Verdünnung notwendig wäre.

Die parenterale Verwendung von Saccharose stellt aufgrund vielfältiger zugelassener Produkte ebenfalls kein Problem dar. Die positiven Ergebnisse der Daclizumab (Kapitel III.5) Bulkwirkstofflösung legen auch die Verwendung von Trehalose nahe. Verschiedene Literaturstellen [37, 72, 99, 103-107, 126] belegen deren stabilisierende Eigenschaften. Mit der Zulassung von Herceptin® (Trastuzumab) hat auch Trehalose den Einzug in parenteral applizierte Arzneimittel vollzogen.

#### 7.1.4. Übersicht und Proben­tabelle

Die Tabelle III-21 und Tabelle III-22 geben einen Überblick über sämtliche Formulierungen, die hinsichtlich ihrer Einfrierstabilität getestet wurden. Die Proben wurden mittels SE-HPLC und Licht-Blockade Messung untersucht. Als Negativkontrolle für die Licht-Blockade wurden sämtliche Formulierungen als Placebo, also eine identische Pufferzusammensetzung ohne Antikörper, vermessen.

**Tabelle III-21**

*Übersicht: Formulierungen von Daclizumab Kaliumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7.0 und einer Antikörperkonzentration von 15 mg/mL*

Nr.	Puffer	Excipient 1	/Konzentration
1	K-PO <sub>4</sub> 10 mM	---	
2	K-PO <sub>4</sub> 25 mM	---	
3	K-PO <sub>4</sub> 50 mM	---	
4	K-PO <sub>4</sub> 10 mM	Polysorbat 80	0.01 %
5	K-PO <sub>4</sub> 25 mM	Polysorbat 80	0.01 %
6	K-PO <sub>4</sub> 50 mM	Polysorbat 80	0.01 %
7	K-PO <sub>4</sub> 10 mM	Polysorbat 80	0.02 %
8	K-PO <sub>4</sub> 25 mM	Polysorbat 80	0.02 %
9	K-PO <sub>4</sub> 50 mM	Polysorbat 80	0.02 %

**Tabelle III-22**

*Übersicht: Formulierungen von Daclizumab in Natriumphosphat / Natriumchloridpuffer bei einem pH-Wert von 6.9 und einer Antikörperkonzentration von 15 mg/mL*

Nr.	Puffer	Excipient 1	/Konzentration	Excipient 2	/Konzentration
1	PBS-Puffer			---	
2	PBS-Puffer	Polysorbat 80	0.01 %	---	
3	PBS-Puffer	Polysorbat 80	0.02 %	---	
4	PBS-Puffer	Saccharose	40 mM	---	
5	PBS-Puffer	Saccharose	60 mM	---	
6	PBS-Puffer	Saccharose	120 mM	---	
7	PBS-Puffer	Saccharose	120 mM	Polysorbat 80	0.02 %
8	PBS-Puffer	Trehalose	10 mM	---	
9	PBS-Puffer	Trehalose	20 mM	---	
10	PBS-Puffer	Trehalose	40 mM	---	
11	PBS-Puffer	Trehalose	60 mM	---	
12	PBS-Puffer	Trehalose	40 mM	Polysorbat 80	0.02 %

## 7.2. Ergebnis der Präformulierungsstudie

### 7.2.1. Aggregationsverhalten – SE-HPLC

Der Antikörper zeigte im bisherigen Bulkpuffer eine deutliche Instabilität in Form von Aggregatbildung. Bei einer Konzentration von 6.3 mg/mL Antikörper waren nach 5 Einfrier- und Auftauzyklen ca. 11 % Aggregate nachweisbar. Bei einer höheren Antikörperkonzentration von 15 mg/mL ohne Zusatz von Hilfsstoffen stieg der Anteil an Aggregaten auf knapp 25 %.

#### **Polysorbat 80 in PBS-Puffer**

Der Zusatz von bis zu 0.02 % Polysorbat 80 hatte keinen positiven Effekt auf die Proteinstabilität (Abbildung III-37).

#### **Kaliumphosphat-Puffer**

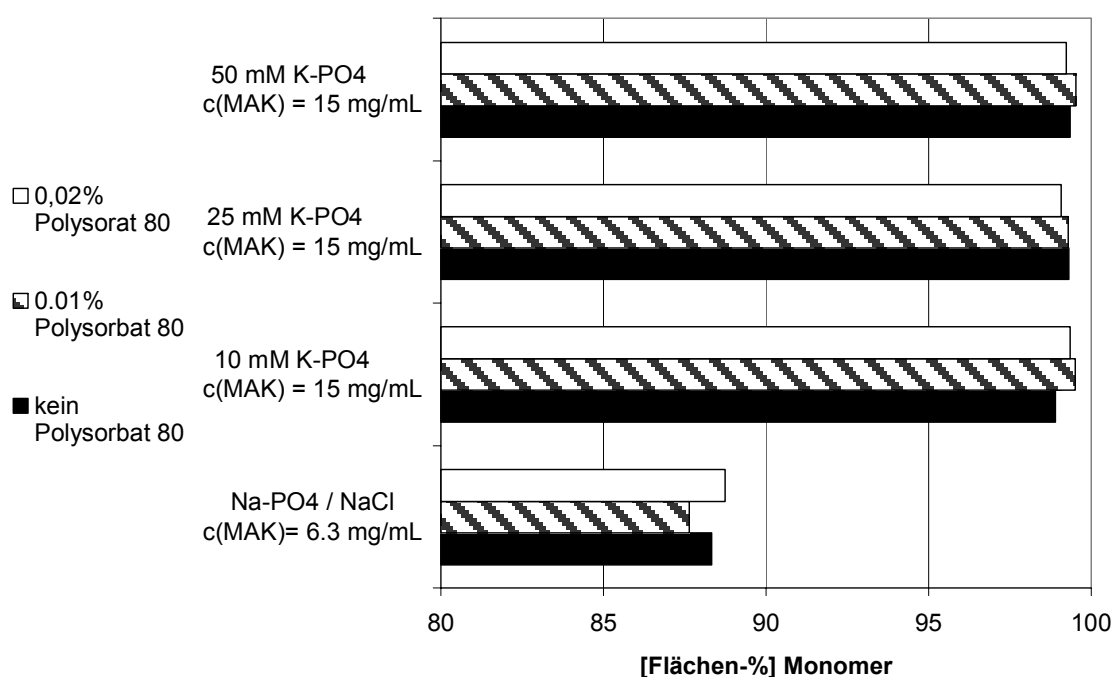
Im Kaliumphosphat Puffer war hingegen keine Zunahme an Aggregaten oder Oligomeren nachweisbar, d. H. der Austausch von Natriumphosphat gegen Kaliumphosphat führt zu einer deutlichen Stabilisierung.

### PBS-Puffer mit Disacchariden

Der Zusatz von Saccharose und Trehalose zeigten eine weitere Möglichkeit auf, die Aggregatbildung zu verhindern: Trotz der hohen Antikörperkonzentration von 15 mg/mL konnte unter Zusatz von nur 10 mM Trehalose eine deutliche Abnahme aggregierter Spezies erreicht werden. Ab 40 mM Trehalose konnte keine Zunahme der Aggregate infolge der Einfrierexperimente mehr festgestellt werden. Unter Zusatz von Saccharose war eine deutlich höhere Konzentration (120 mM) des Zuckers notwendig, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen (Abbildung III-38). Das für die vollständige Stabilisierung (Abnahme des Monomergehalts  $< 0.1\%$ ) notwendige molare Verhältnis zwischen Excipient und Protein betrug bei Trehalose 1 : 0.10, respektive 1 : 1.2 bei Saccharose.

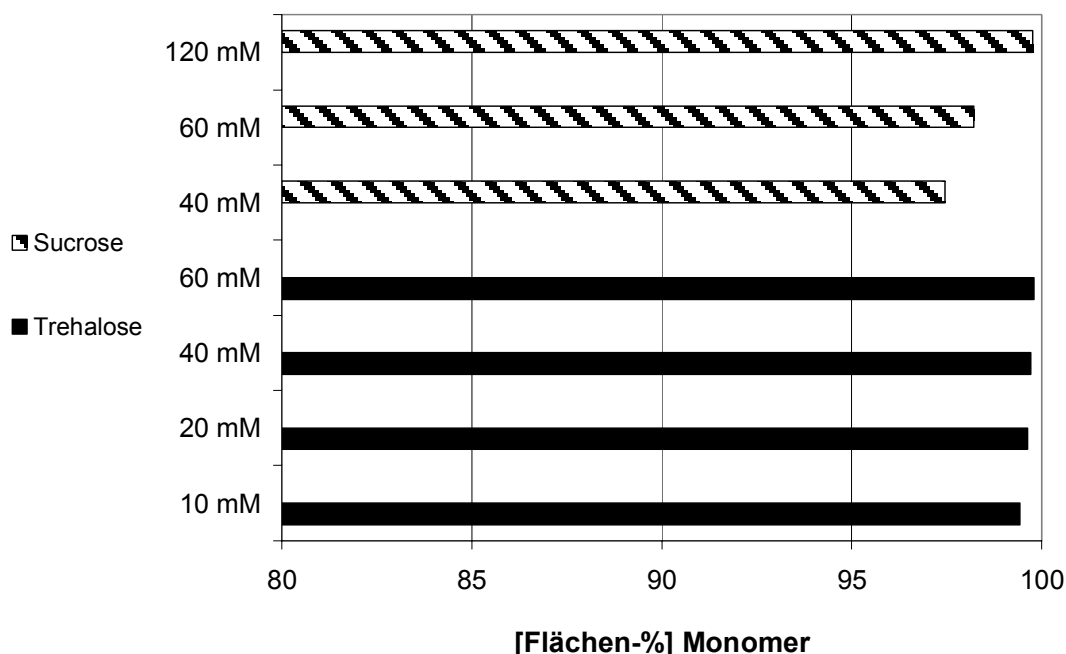
### Abbildung III-37

*Einfluss von Polysorbat 80 auf die Aggregation von Daclizumab in Natrium- und Kaliumphosphat Puffer pH 7.0*



**Abbildung III-38**

*Einfluss von Saccharose und Trehalose auf die Aggregatbildung von Daclizumab in Natriumphosphat / Natriumchlorid-Puffer pH 6.9. Die Antikörperkonzentration betrug 15 mg/mL.*



### 7.2.2. Präzipitation von Daclizumab

Die Auswertung der in den verschiedenen Formulierungen gebildeten Partikel mittels Licht-Blockademessung zeigte keine einheitliche Korrelation zu den Ergebnissen der SE-HPLC.

#### Kaliumphosphat-Puffer

Die geringste partikuläre Verunreinigung wurde im 10 mM Kaliumphosphatpuffer festgestellt werden. Erstaunlicherweise waren im höher konzentrierten Kaliumphosphatpuffer sogar geringfügig mehr Partikel nachweisbar als im PBS-Puffer.

Durch den Zusatz von Polysorbat 80 konnte eine deutliche Reduktion der Partikelzahlen in allen Puffermedien erzielt werden. Bei höherer Tensidkonzentration war der Effekt stärker ausgeprägt (Abbildung III-39). Die Placebo-Lösungen ohne Protein wies keine signifikante Partikelzunahme auf.

#### Disaccharide in PBS-Puffer

Die Ergebnisse der zuckerhaltigen Antikörperlösungen zeigten ein heterogenes Ergebnis. Durch den Zuckeranteil war direkt nach dem Auftauen eine vorübergehende Niederschlagsbildung optisch erkennbar. Erst nach längerem vorsichtigen Schwenken lösten

sich die Partikel wieder auf. Als Referenz wurden auch hier wieder Placebo-Lösungen gleichbehandelt und vermessen.

Auch die Partikelmessungen der saccharosehaltigen Placebo Lösung zeigten eine geringfügige Partikelzunahme infolge der Einfrierexperimente, die auch durch 48-stündige Lagerung nicht weiter reduziert werden konnte.

Die Verumproben wiesen jedoch deutlich höhere Partikelwerte als die Placeboproben. Darüber hinaus war nur bei den Placeboproben eine Korrelation zwischen Partikelzahlen und Zuckerkonzentration nachweisbar (Abbildung III-40).

Die Partikelzahlen der Trehalose Placebolösung waren gegenüber den Saccharoseproben deutlich geringer. Weder bei den Placebo- noch bei den Verumproben war eine Korrelations zwischen Zuckerkonzentration und Partikelzahlen nachweisbar. Die Verumproben zeigen wiederum eine signifikante Zunahme an ungelösten Schwebeteilchen (Abbildung III-41).

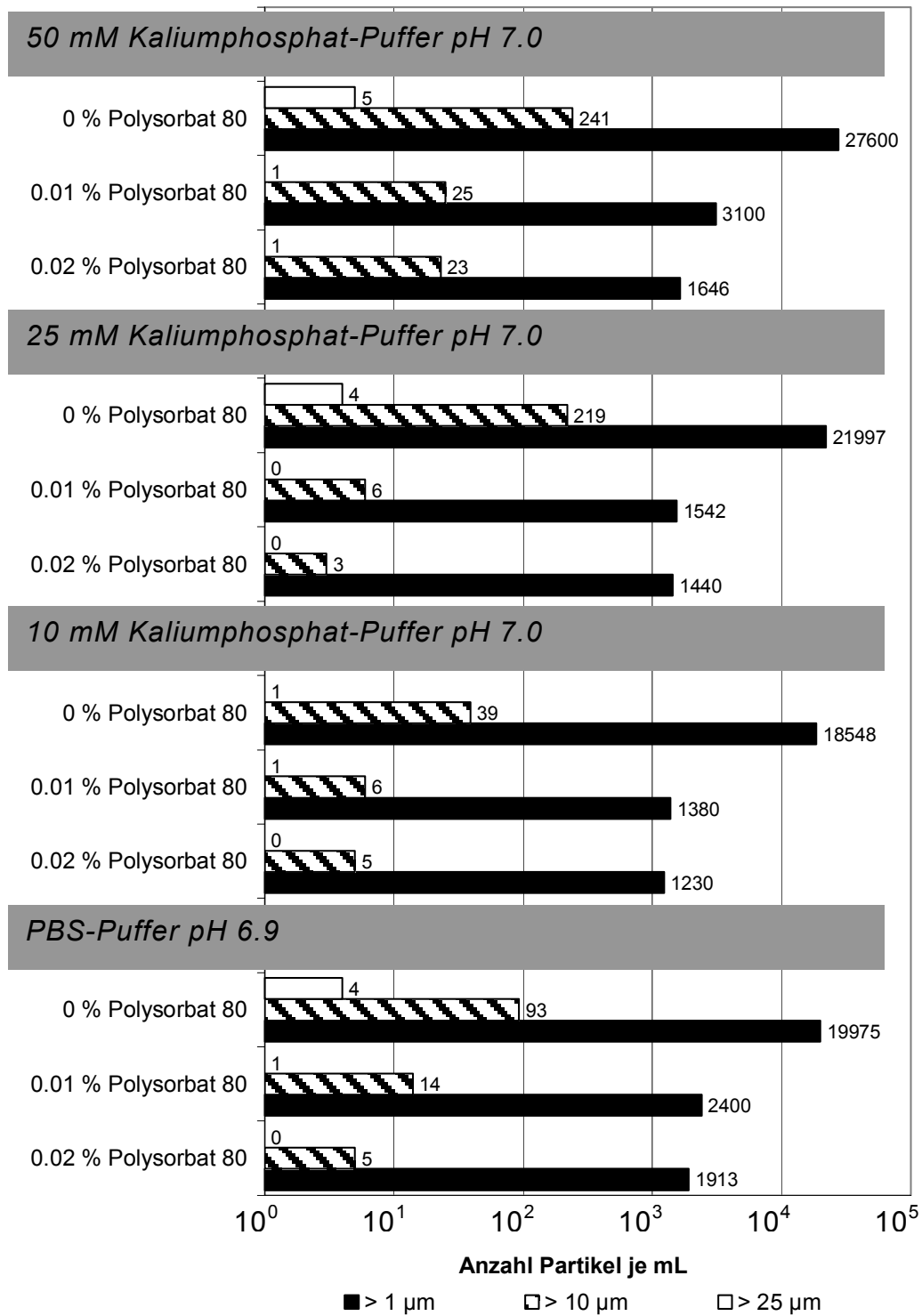
Beide Hilfsstoffe sind für die Anwendung in Parenteralia zugelassen und auch in der Literatur konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden, die einen Grund für diese partikulären Verunreinigungen erklären würden. Eine Auswertung der Widerfindung des monomeren Proteins allerdings ergab, dass der Monomergehalt mit in Gegenwart von Saccharose um durchschnittlich zu 5 % abnahm. Im Falle der Trehalose konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits die Entscheidung getroffen worden war, einer polysorbathaltigen Kaliumphosphatformulierung den Vorzug zu geben, wurde darauf verzichtet dieses Phänomen genauer zu untersuchen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Gegenwart von Saccharose die Präzipitation des Proteins erhöht war.



Abbildung III-39

Partikelbildung von Daclizumab Bulklösung in Natriumphosphat/Natriumchlorid bzw. Kaliumphosphatpuffer 10, 25 und 50 mM.



**Abbildung III-40**

*Anzahl an ungelösten Partikeln in saccharosehaltigen Placebo- und Verumproben (PBS-Puffer).*

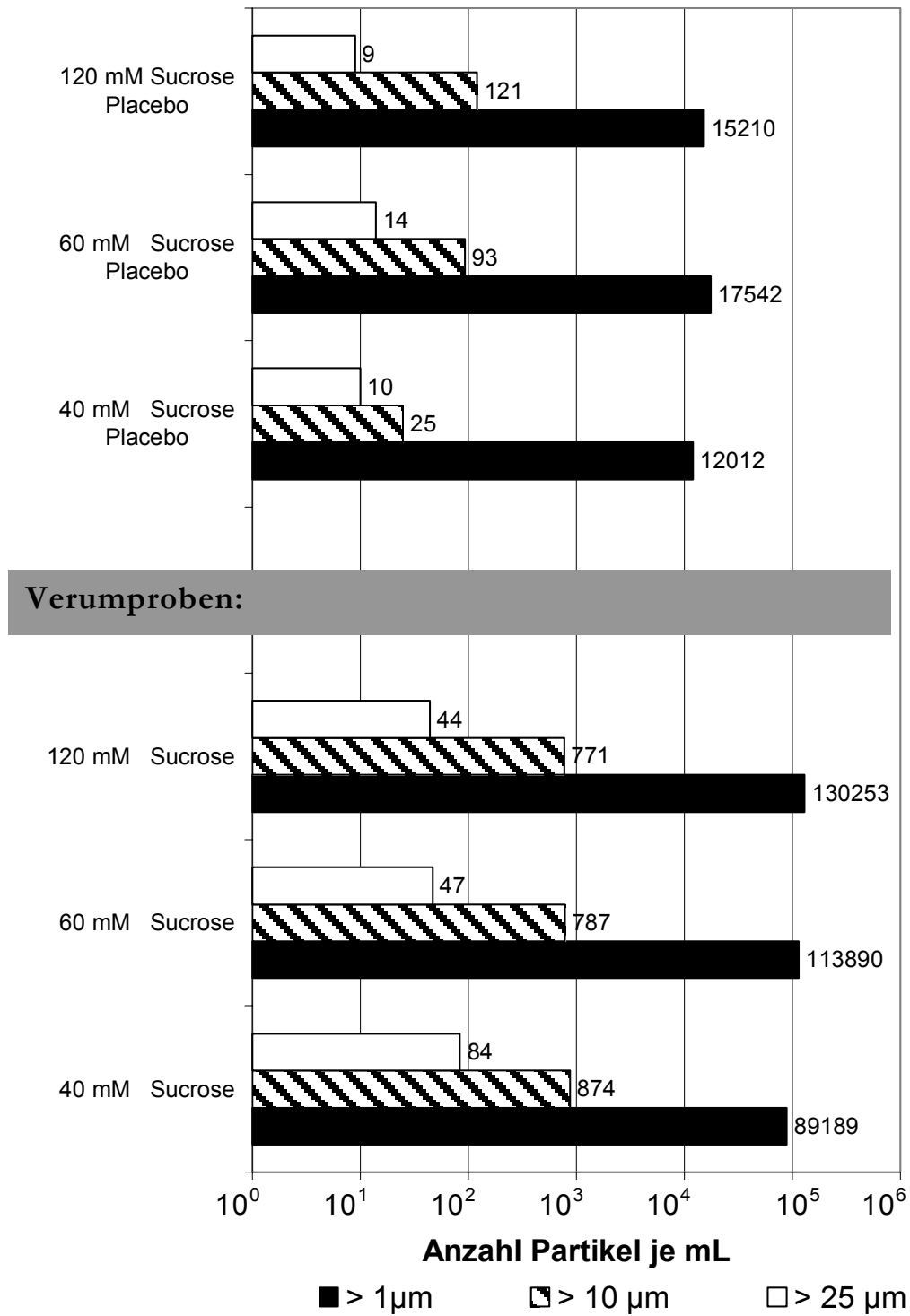
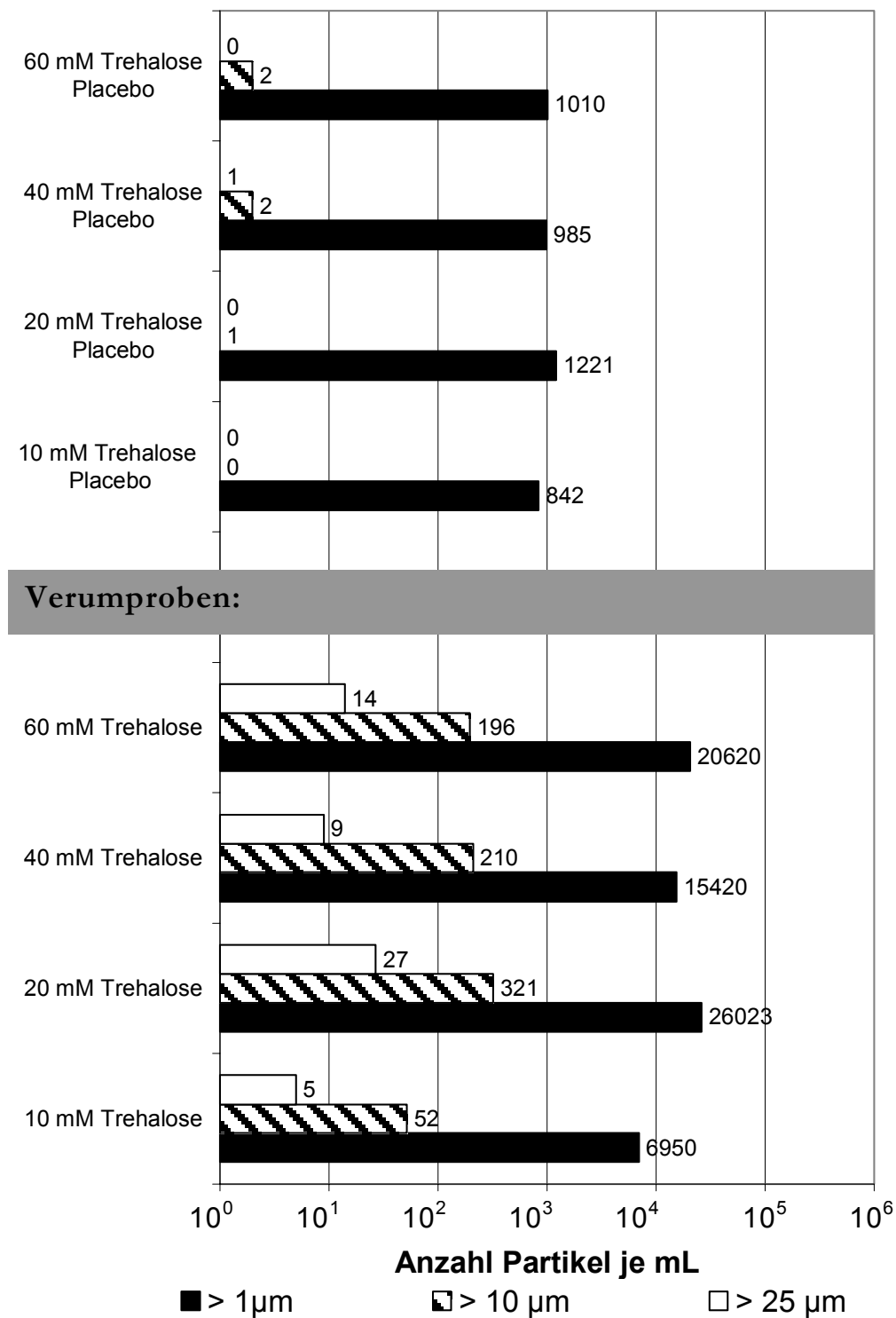


Abbildung III-41

Anzahl an ungelösten Partikeln in trehalosehaltigen Placebo- und Verumproben (PBS-Puffer).



### 7.2.3. Stabilisierung von Daclizumab mittels Disaccharid und Polysorbat 80

Um abzuklären, ob es auch in Gegenwart der Disaccharide zu einer Denaturierung des Proteins und anschließender Aggregation kommt, die denaturierten Spezies jedoch aufgrund verstärkter Präzipitation unlöslich und somit nicht mittels SE-HPLC nachweisbar wären, wurde eine Formulierung mit Trehalose (40 mM) Saccharose (120 mM) und Polysorbat 80 (0.02 % m/V) ebenfalls überprüft.

Bei diesen Konzentrationen an Disaccharid war aufgrund der Vorversuche eine vollständige Protektion des Proteins hinsichtlich Aggregation zu erwarten. Die gewählte Tensidkonzentration hatte bei den Vorversuchen eine nahezu vollständige Inhibierung der Präzipitation bewirkt.

**Tabelle III-23**

*Bildung von unlöslichen Partikeln und Aggregaten vor und nach 5 Einfrierzyklen*

Probe		Partikel			SE-HPLC [Flächen-% Monomer]
		> 1 µm	> 10 µm	> 25 µm	
<b>Daclizumab 15 mg/mL, 40 mM Trehalose, 0.02 % Polysorbat 80</b>	<i>Ausgangswert:</i>	212	0	0	99,79
	<i>Nach 5 Einfrierzyklen:</i>	858	1	0	99,80
<b>Daclizumab 15 mg/mL, 120 mM Saccharose, 0.02 % Polysorbat 80</b>	<i>Ausgangswert:</i>	342	1	0	99,79
	<i>Nach 5 Einfrierzyklen:</i>	1342	2	1	99,79

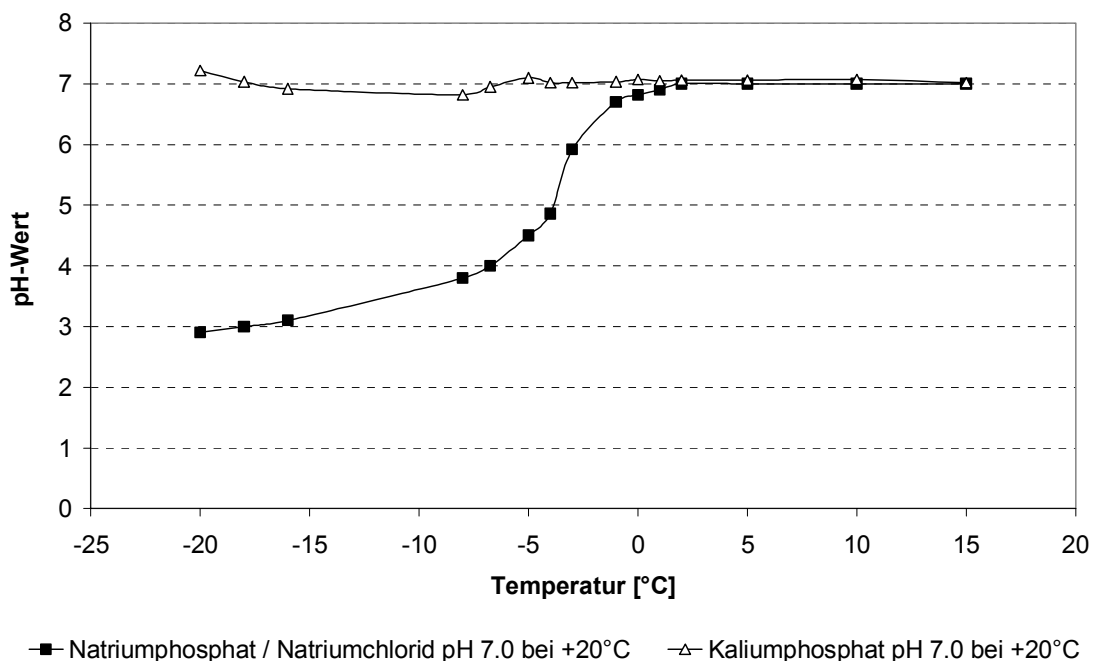
Wie aus Tabelle III-23 ersichtlich ist, konnte in beiden Fällen nach 5 Einfrierzyklen weder eine Zunahme aggregierter Spezies, noch eine nennenswerte Bildung von unlöslichen Schwebeteilchen festgestellt werden. Die Zugabe von Polysorbat 80 konnte auch in Gegenwart der Disaccharide die Bildung von unlöslichen Schwebeteilchen verhindern. Ein Produktverlust infolge Denaturierung und anschließender Aggregation oder Präzipitation konnte somit ausgeschlossen werden.

### 7.3. Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität des Antikörpers

Mit Hilfe eines temperaturkompensierten pH-Meters konnte gezeigt werden, dass der PBS-Puffer während des Einfrierprozesses einer deutlichen pH-Wert Absenkung unterliegt. Abbildung III-42 zeigt den pH-Wert-Verlauf des Puffers in Abhängigkeit der Temperatur. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  sank der pH-Wert bis zu 4 Einheiten ab. Der Grund hierfür liegt in der geringeren Löslichkeit von Dinatriumhydrogenphosphat bei tiefen Temperaturen. Dieses kristallisiert während des Einfrierprozesses aus. Folglich kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes, da die saure Pufferkomponente in der einfrierenden Lösung überwiegt.

**Abbildung III-42**

*pH-Wert Veränderung von Natriumphosphat (67mM) /Natriumchlorid (87.8 mM) im Vergleich zu Kaliumphosphat (10 mM) Puffer in einer gefrierenden Lösung*



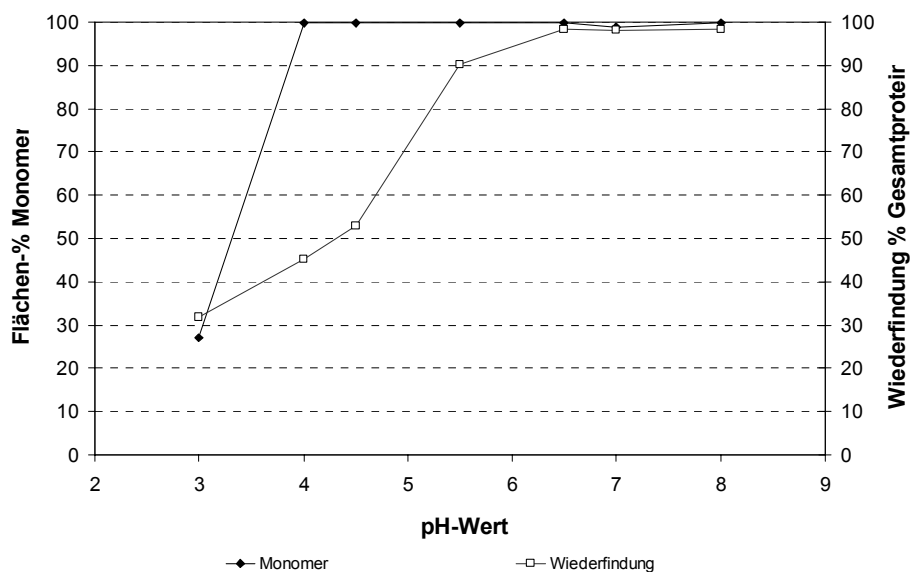
Um festzustellen, ob der pH-shift des Natriumphosphatpuffers für die Bildung aggregierter Antikörperspezies verantwortlich ist, wurde Daclizumab in Kaliumphosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 3 und 8 den gleichen Einfrierversuchen wie bisher unterworfen und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie und Lichtblockade Messung analysiert. Sollte der Grund für die Aggregation in dem pH-shift des Natriumphosphatpuffers liegen, so wäre auch im Kaliumphosphatpuffer eine ähnliche Denaturierung mit anschließender Oligomerbildung zu erwarten. Da das Protein während des gesamten Einfrierprozesses diesem unvorteilhaften pH-Wert ausgesetzt ist, war zu erwarten, dass das Ausmaß der Aggregation deutlich über dem im Natriumphosphatpuffer liegen

würde. Diese Überlegung wurde durch die in Abbildung III-43 dargestellten Ergebnisse der SE-HPLC bestätigt.

Die Auswertung der Ergebnisse der Lichtblockade Messung hingegen weisen einen gegenläufigen Trend auf (Abbildung III-44). Mit abnehmendem pH-Wert ist eine deutliche Reduktion der unlöslichen Schwebeteilchen feststellbar. Insbesondere sehr kleine Partikel im Größenbereich zwischen 1 und 10  $\mu\text{m}$  sind bei pH-Werten zwischen 3 und 7 sehr gering. Allerdings zeigt sich, dass bei pH-Werten größer als 7 der Anteil des präzipitierten Proteins sehr stark zunimmt.

#### Abbildung III-43

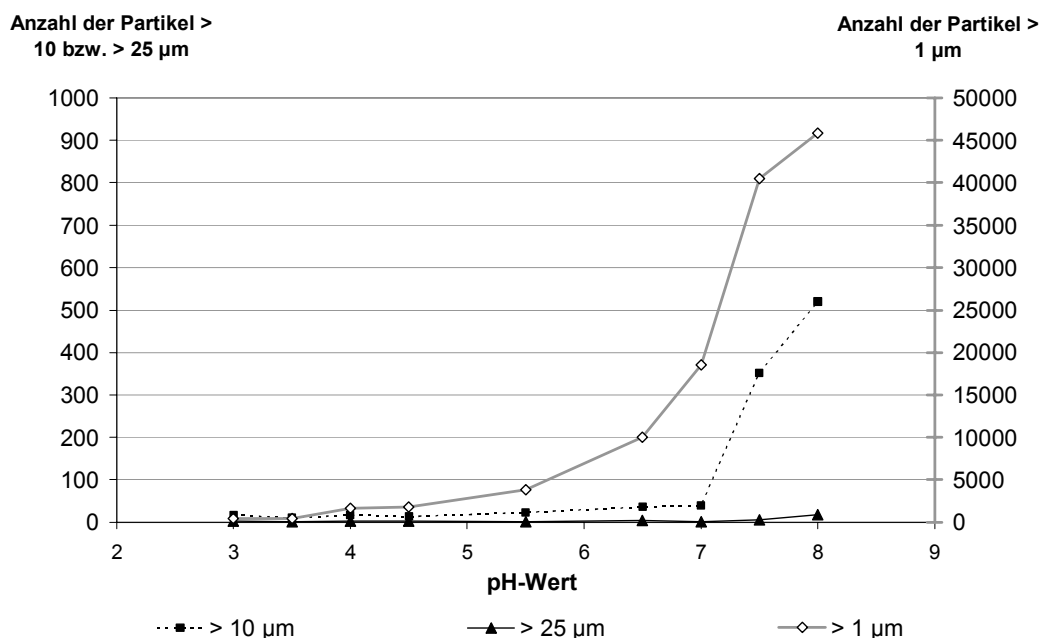
*Oligomerbildung (SE-HPLC) von Daclizumab in 10 mM Kaliumphosphatpuffer in Abhängigkeit des pH-Wertes bei +20°C. Ab einem pH-Wert von 4 und kleiner ist eine deutliche Zunahme der Aggregation feststellbar.*



Die Auswertung der Wiederfindung des Antikörpers in der SE-HPLC zeigt sehr deutlich, dass bei pH-Werten von 5.5 und darunter mit einem deutlichen Proteinverlust zu rechnen ist, obwohl nahezu keinerlei Partikel mit Hilfe der Lichtblockade feststellbar sind. Mögliche Ursachen könnten Adsorptionsphänomene an Gefäßwandungen, oder auch der weder von SE-HPLC noch von Lichtblockade erfasste Größenbereich zwischen 0.1 und 1  $\mu\text{m}$  sein.

**Abbildung III-44**

*Partikelbelastung von Daclizumab (15 mg/mL) nach 5 Einfrierzyklen in Kaliumphosphatpuffer 10 mM bei unterschiedlichen pH-Werten.*



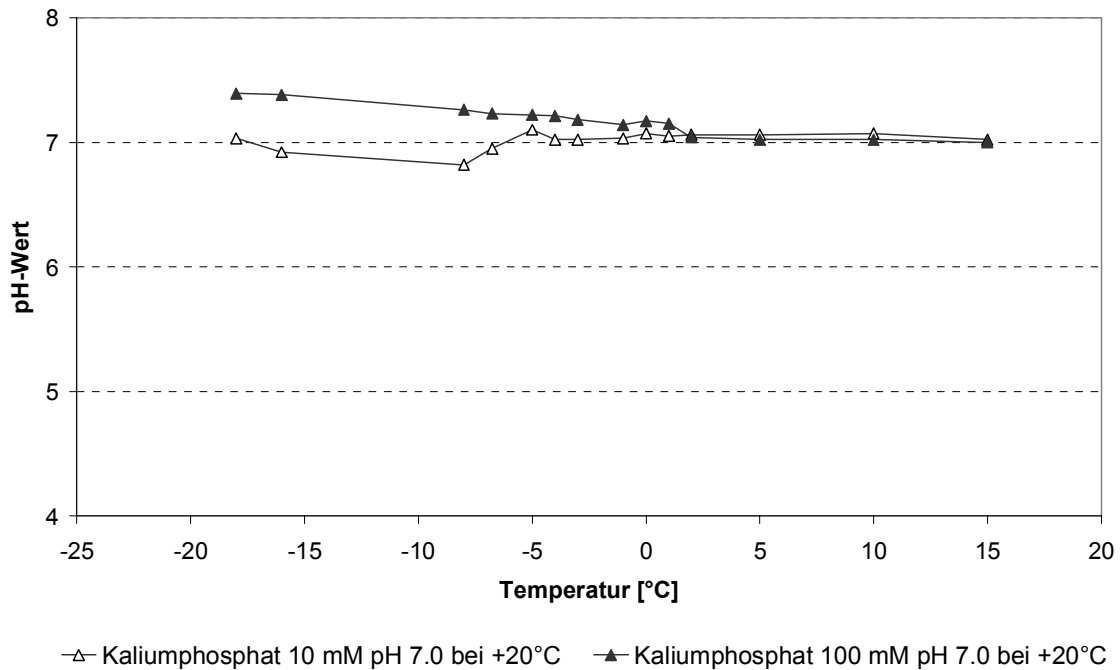
Der Grund für die erhöhte Partikellast in Daclizumab im 50 mM Kaliumphosphatpuffer gegenüber 10 mM Kaliumphosphat scheint in dem geringfügigen stärker ausgeprägten pH-shift des höher konzentrierten Puffers zu liegen. Im Gegensatz zu Natriumphosphat erhöht sich der pH-Wert von Kaliumphosphatpuffer durch den Einfrierprozess geringfügig. Durch Zunahme der Pufferkonzentration wird dieser Effekt verstärkt. Dies kann analog zum Natriumphosphatpuffer mit Hilfe der Löslichkeiten der unterschiedlich protonierten Phosphatsalze des Kaliums und der Lösungsenthalpie erklärt werden. Die Kristallisation von Kaliumphosphatsalzen ist ein exothermer Prozess. Daher ist die Löslichkeit dieser Salze bei tiefer Temperatur erniedrigt. Die Löslichkeit von Dikaliumhydrogenphosphat ist mit 222 g/L (+20°C) um mehr als den Faktor 7 geringer als von Kaliumdihydrogenphosphat 1600 g/L (+20°C, aus [115]). Eine Erhöhung der Konzentration der Pufferkomponenten führt dazu, dass während des Einfrierprozesses im Verhältnis mehr Dikaliumhydrogenphosphat ausfällt und sich der pH-Wert stärker erhöht. Dieser Sachverhalt konnte auch experimentell nachgewiesen werden (Abbildung III-45). War bei einer Konzentration von 10 mM nahezu kein pH-shift nachweisbar, stieg der pH-Wert bei 50 mM um immerhin 0.3 Einheiten an.

Durch die Zugabe von 0.02 % (m/V) Polysorbat 80 konnte im gesamten pH-Bereich von 5.5 bis 8.0 eine deutliche Reduktion der unlöslichen Partikel erreicht werden. Abbildung III-46

zeigt den Verlauf der Partikelzahlen (Größenbereich  $> 1 \mu\text{m}$ ) je mL mit und ohne Zugabe von Polysorbat 80.

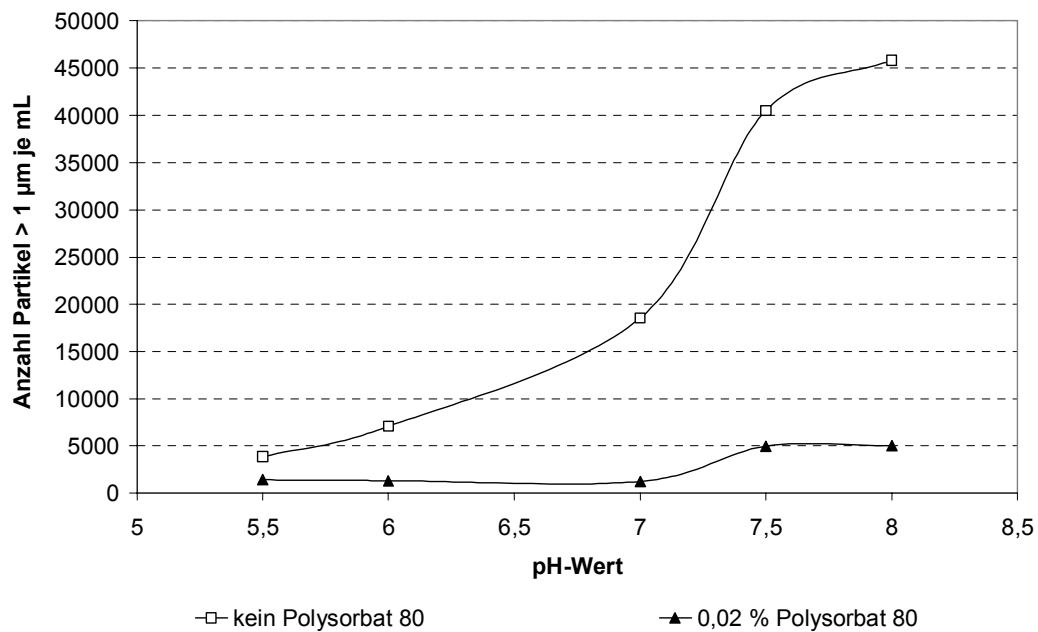
**Abbildung III-45**

*pH-Wert / Temperatur-Verlauf von 10 mM (---Δ---) und 100 mM (---▲---) Kaliumphosphatpuffer im Vergleich*



**Abbildung III-46**

*Vergleich der unlöslichen Partikel  $> 1 \mu\text{m}$  je mL Lösung: ohne Polysorbat 80 (---□---) und mit 0.02 % (m/V) Polysorbat 80 (---▲---). Die Partikelzahlen  $> 10 \text{ bzw. } > 25 \mu\text{m}$  bestätigen diesen Trend.*





## 7.4. Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie zeigen sehr deutlich, dass Disaccharide sehr potente Excipienten zur Stabilisierung von Proteinen während des Einfrierprozesses sind. Insbesondere Trehalose kann bereits in einer geringen Konzentration die Bildung aggregierter Spezies quantitativ unterbinden. Carpenter et al. [108, 109, 110] konnten einen ähnlichen Effekt bei der Stabilisierung von Phosphofructokinase und Trastuzumab [126] während Einfrier- und Trocknungsprozessen nachweisen. Auch mit Hilfe von Saccharose kann ein vergleichbarer Effekt erzielt werden, allerdings war hierzu eine deutlich höhere Konzentration des Hilfsstoffes notwendig. Die beobachtete pH-Wert abhängige Aggregation des Antikörpers im Kaliumphosphatpuffer und der nachweisbare pH-shift des Natriumphosphatpuffers zeigen, dass diese pH-Wert Verschiebung während des Einfrierprozesses der eigentliche Grund der Instabilität sind. Durch den Zusatz von Zuckern kann lediglich eine Stabilisierung des Proteins gegenüber pH-Wert induzierter Aggregation erzielt werden. Dies kann über eine Stabilisierung des nativen Zustands oder einer beschleunigten Renaturierung während des Auftauprozesses erreicht werden. Allerdings sprechen die für diese Stoffklasse diskutierten Stabilisierungshypothesen („water replacement“, „glassy state“ oder „preferential exclusion“) in allen drei Fällen für eine Stabilisierung des nativen Proteins.

Die Stabilisierung durch Erhöhung des glasähnlichen Übergangs  $T_g'$  spielt hierbei eine untergeordnete Rolle. Diese Änderung des kinetischen Zustands des hydratisierten Proteins findet in Abwesenheit von Zuckern im Bereich von  $-70^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$  statt [56, 110]. Die Glasübergangstemperatur  $T_g'$ , also der Punkt, an dem die maximal übersättigte und unterkühlte Zucker-Wasser erstarrt, liegt jedoch deutlich unterhalb der in den Versuchen erreichten  $-20^{\circ}\text{C}$ . DSC-Messungen der Bulklösung unter Zusatz von Trehalose oder Saccharose zeigten eine Glasübergangstemperatur  $T_g'$  von  $-36^{\circ}\text{C}$  (Abbildung III-47). Das Protein/Zuckergemisch wird daher bei deutlich tieferen Temperaturen erst diesen vorteilhaften Glaszustand erreichen, der pH-shift ist jedoch bereits bei deutlich höheren Temperaturen nachweisbar. In folge der Kristallisation von Wasser und der Aufkonzentrierung der Lösungsbestandteile steht dem Protein immer weniger Wasser zur Verfügung. Jedoch bleibt die Hydrathülle des Proteins weitgehend erhalten, da die dort gebundenen Wassermoleküle (weniger als 0.3 g Wasser pro Gramm Protein) mit dem Protein im glasartigen Zustand erstarren [110]. Es kann also nicht von einer Entfernung der Hydrathülle gesprochen werden. Eine Stabilisierung über hydrophile Wechselwirkung des Proteins mit dem Zucker („water replacement“) ist daher ebenfalls auszuschliessen.

Carpenter et al. zeigte, dass die Stabilisierung der Enzyme Lactatdehydrogenase und Phosphofructokinase sowie des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab [126] beim Einfrieren und Auftauen durch preferential exclusion bewirkt wird. Die Auswirkungen auf die Proteinstabilität infolge von Veränderungen einer Lösung unterhalb ihres Gefrierpunktes, wie Eiskristallbildung, pH-shift und Aufkonzentrierungseffekte sind dadurch stark reduziert. Auch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Theorie.

Die Ergebnisse der Partikelmessung zeigen keine direkte Korrelation mit den SE-HPLC Daten.

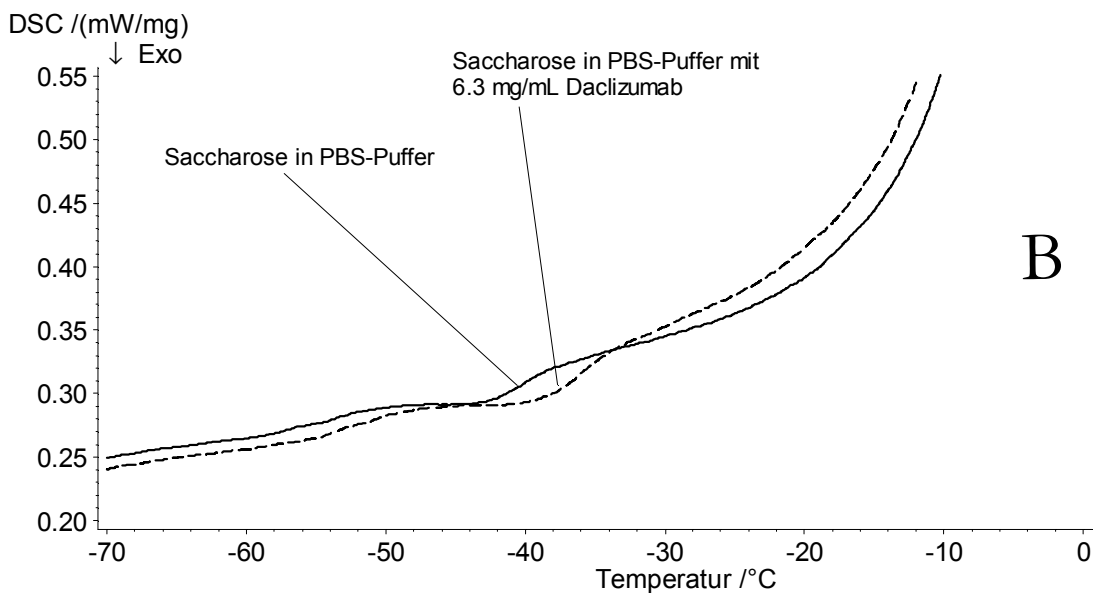
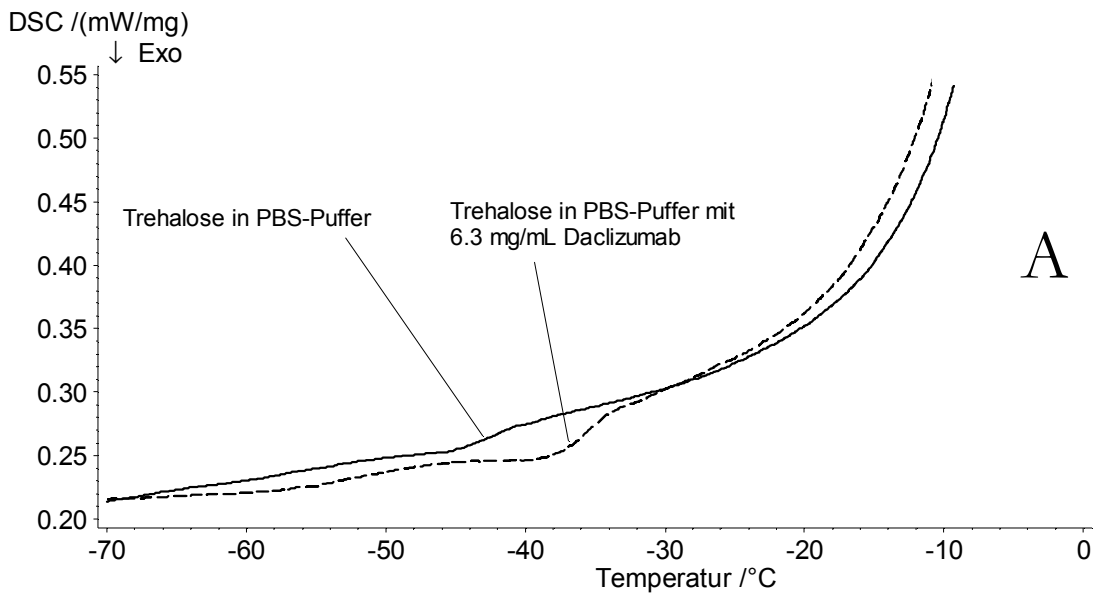
Dies ist auf den ersten Blick sehr überraschend, da häufig angenommen wird, dass die Bildung von löslichen Präzipitaten eine Folgereaktion der Dimerisierung oder Oligomerisierung des Proteins ist. Die in den hier beschriebenen Formulierungen von Daclizumab quantifizierten Partikel scheinen jedoch durch einen unterschiedlichen Mechanismus entstanden zu sein. Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Korrelation von steigendem pH-Wert der Antikörperlösung in Kaliumphosphatpuffer mit der Anzahl an gebildeten Partikel nachweisbar war, lassen sich einige dieser Phänomene erklären. Höher konzentrierter Kaliumphosphatpuffer zeigte einen etwas stärker ausgeprägten pH-shift als in verdünnter Puffer [38]. Die in 50 mM Kaliumphosphatpuffer gebildeten Partikel von Daclizumab bestätigen diese Beobachtung. Ein Grund für die Zunahme der Partikelbildung bei pH-Werten größer als 7 könnte die Abnahme der Löslichkeit des Proteins nahe seiner isoelektrischen (8 bis 9.5) Punkte sein, da die Löslichkeit von Proteinen mit der Nähe zu ihrem isoelektrischen Punkt deutlich abnimmt. Darüber hinaus ist aus dem Aufreinigungsprozess die geringe Löslichkeit der Antikörpers bei pH-Werten höher als 7.5 bekannt.

**Abbildung III-47**

A: DSC-Kurven von gesättigten Trehalose- (A) bzw. Saccharose- (B) Lösungen in PBS-Puffer: Placebo (---) und proteinhaltige (—) Lösung. In Gegenwart von Daclizumab erhöht sich die Lage von  $T_g$ ' (jeweils zweiter Aufheizvorgang) :

A: Trehalose: von  $-42^{\circ}\text{C}$  auf  $-35,5^{\circ}\text{C}$  (Mittelwerte).

B: Saccharose: von  $-40^{\circ}\text{C}$  auf  $-36^{\circ}\text{C}$  (Mittelwerte)



Die Partikelwerte der disaccharidhaltigen Formulierungen weisen auf zweierlei Phänomene hin. Bereits in der proteinfreien Formulierung ist in der saccharosehaltigen PBS-Pufferlösung nach den Einfrierexperimenten eine leicht erhöhte Anzahl an unlöslichen Partikeln nachweisbar, die sich auch nach mehrtägiger Lagerung bei Raumtemperatur nicht aufgelöst hatten. Die Herkunft der Partikel kann nicht nachhaltig begründet werden. Möglicherweise handelt es um schwerlösliche Salzkristalle, die durch Verunreinigungen der Saccharose verursacht werden. Denkbar wäre beispielsweise die Bildung von schwerlöslichem Calciumphosphat. Die Korrelation zwischen Anzahl an gebildeten Partikeln und Zuckerkonzentration stützt diese Vermutung. In den Verumproben allerdings ist eine direkte Korrelation zwischen Zuckerkonzentration und Partikelzahl nicht erkennbar. Hier liegt die Anzahl und Größe der Schwebeteilchen deutlich über dem der Placebolösung. In Gegenwart von Saccharose zeigte der Antikörper im PBS-Puffer bei pH 6.9 eine Tendenz zur Bildung schwer- oder unlöslicher Proteinpräzipitate.

Im Gegensatz zur Saccharose ist bei den trehalosehaltigen Proben dieses Phänomen weit weniger stark ausgeprägt. Die Ergebnisse der Partikelwerte der Verum- und Placeboproben unterscheiden sich nur marginal.

Um jedoch sicher auszuschließen, dass sich Proteinaggregate durch die Bildung von unlöslichen Partikeln dem Nachweis in der SE-HPLC entziehen, wurde in beiden Fällen auch der Zusatz von 0.02 % Polysorbat 80 untersucht. Hierdurch konnte die Zahl der Schwebeteilchen deutlich gesenkt werden, eine Zunahme an Dimeren war jedoch in beiden Fällen nicht nachweisbar. Mittels der Disaccharide war es also möglich den Antikörper auch gegen eine pH-induzierte Denaturierung und nachfolgende Aggregation zu stabilisieren. Die Bildung von schwerlöslichen Partikeln konnte nicht nachhaltig beeinflusst werden.

Erst durch die Zugabe eines nichtionischen Tensids verringerte sich die Präzipitation des Proteins. Durch Assoziation des Tensids an die Lösungsbestandteile können intermolekulare Wechselwirkungen reduziert und somit eine schnellere und bessere Wiederauflösung erreicht werden.

## 7.5. Scale Up

### 7.5.1. *Einleitung und Versuchsdesign*

Um im Large Scale für Daclizumab Bulkwirkstofflösung eine tiefgekühlte Lagerung zu ermöglichen, wurde die Stabilität des Proteins nach mehreren Einfrierzyklen in der KVS-Temperieranlage überprüft. Die in der Präformulierungsstudie entwickelte Bulklösung bestehend aus 25 mM Kaliumphosphat, pH 7.0, 0.02 % Polysorbat 80 bei einer Antikörperkonzentration von 15 mg/mL erschien aufgrund der hervorragenden Stabilitätsdaten als viel versprechend. Als Primärpackmittel dienen die bereits beschriebenen Edelstahlbehälter mit einem Füllvolumen von 15 L. Das Produkt wurde in den Temperieranlagen, die mit Flüssigstickstoff gespeist werden, auf  $-75^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  eingefroren, dann auf  $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  umgelagert und anschließend wieder aufgetaut.

### 7.5.2. *Einfrieren, Lagerung und Auftauen*

Um einen schnellen Einfrierprozess zu gewährleisten wurde als Einfrierrezept das bereits aus den Versuchen mit Interferon und Trastuzumab bekannte Programm gewählt. Hierbei wird eine Produkttemperatur von mindestens  $-75^{\circ}\text{C}$  erreicht. Die Vorteile dieses Rezepts sind der geringe Validierungsaufwand und die in den PQ-Läufen gesammelte Erfahrung sowie die sehr kurze Prozesszeit von drei Stunden.

Für die spätere Produktion ist es möglich, nach dem Einfrieren in der KVS-Anlage, die Produktlösung in Kühlräume mit  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Hintergrund ist die Bereitstellung der notwendigen Kühlkapazität. Dieser Schritt wurde durch Erhöhung der Kammertemperatur der KVS-Anlage von  $-75^{\circ}\text{C}$  auf  $-20^{\circ}\text{C}$  simuliert. Nach einer ausreichenden Lagerphase bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wird automatisch das für diese Schrankbeladung passende Auftaurezept gestartet.

Das Auftaurezept war für die gewählte Schrankbeladung so konzipiert, dass die zu keinem Zeitpunkt eine Temperatur von  $+15^{\circ}\text{C}$  überschreitet.

### 7.5.3. *Versuchsdurchführung und Probenziehung*

Verwendet wurden 75 L Bulkwirkstofflösung mit einer Konzentration von 6.3 mg/mL in PBS-Puffer, die vor Versuchsbeginn auf eine Antikörperkonzentration von  $15\text{ mg/mL} \pm 0.5\text{ mg/mL}$  aufkonzentriert und mittels Tangential Fluss Filtration in einen Puffer von 25 mmol/L Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 7.0 umgepuffert wurden. Der Zusatz von Polysorbat 80 in einer Endkonzentration von 0.02% (m/V) erfolgte nach Abschluss der

Diafiltration. Die somit erhaltenen 30 L Bulkwirkstofflösung wurden anschließend zu je 15 L aliquotiert und durch Filtration (0.2 µm) in 2 Edelstahlbehälter (gereinigt und autoklaviert) überführt. Die beiden Behälter wurden insgesamt fünf Einfrier- und Auftauzyklen in der KVS-Anlage unterzogen.

Um die Stabilität des Proteins sowohl während der Umpufferung, als auch während der Einfrierversuche zu überprüfen, wurden vor und nach den wichtigsten Prozessschritten Proben gezogen. Eine genaue Übersicht gibt Tabelle III-24.

**Tabelle III-24**

*Probenziehungsplan für Scale Up – Daclizumab*

Nr.	Probenbezeichnung	Erklärung	Verwendung
1	Probe A0	vor Diakonzentration	SEC-HPLC, Partikelmessung
2	Probe A1	nach Diakonzentration	SEC-HPLC, Partikelmessung
3	Probe A2	nach Diafiltration / Umpufferung	SEC-HPLC, Partikelmessung, OD 280
4	Probe Z-0	Nach Abfüllung / Filtration (0.2 µm), Ausgangswert	SEC-HPLC, Partikelmessung, OD 280
5	Probe Z-1 – Cont. I	Nach 1. Zyklus	SEC-HPLC, Partikelmessung
6	Probe Z-1 – Cont. II		
7	Probe Z-3 – Cont. I	Nach 3. Zyklus	SEC-HPLC, Partikelmessung
8	Probe Z-3 – Cont. II		
9	Probe Z-5 – Cont. I	Nach 3. Zyklus	SEC-HPLC, Partikelmessung
10	Probe Z-5 – Cont. II		

#### 7.5.4. Ergebnisse

##### 7.5.4.1. Stabilität von Daclizumab während Diakonzentration und Diafiltration

Der Antikörper war unter den gewählten Bedingungen der Diakonzentration und Diafiltration stabil. Es konnte keine Zunahme von Dimeren oder Oligomeren mittels SE-HPLC festgestellt werden. Die Ergebnisse der SE-HPLC und Lichtblockade-Messung sind in **Tabelle III-25** zusammengefasst. Die Abweichungen der SE-HPLC liegen innerhalb der Toleranz der Methode. Lediglich mittels Lichtblockade-Messung war nach der Umpufferung die Bildung von unlöslichen Partikeln nachweisbar, die auch optisch in Form einer leichten Trübung bzw. Opaleszenz auffiel. Die Zunahme, die nach der Diakonzentration beobachtet wurde kann eben durch diesen Effekt, also der Aufkonzentrierung auch der unlöslichen Partikel im Retentat erklärt werden. Die Ursache für die Präzipitation des Proteins während der Diafiltration sind Grenzflächeneffekte und physikalische Scherkräfte, denen der Antikörper während der langen Diafiltration (ca. 16 h) ausgesetzt war. Durch die Filtration über einen 0.2 µm Filter konnten die unlöslichen Partikel entfernt werden, die Lösung war nach optischer Kontrolle wieder klar. Die Licht-Blockade Messung bestätigte diese Beobachtung.

**Tabelle III-25**

*Ergebnisse der SE-HPLC und Lichtblockade Messung nach Aufkonzentrierung und Umpufferung*

Probenbezeichnung	SE-HPLC Flächen-%- Monomer	Anzahl Partikel je mL		
		> 1 µm	> 10 µm	> 25 µm
Probe A0	99,83	12407	109	8
Probe A1	99,77	50346	635	58
Probe A2	99,74	255915	6045	78
Probe Z0 Cont. I	99,77	409	12	1
Probe Z0 Cont. II	99,81	441	10	0

Die Bestimmung der Proteinkonzentration vor (15.8 mg/mL) und nach (15.3 mg/mL) der Filtration (0.2µm) ergab immerhin einen Produktverlust von 0.5 mg/mL. Das heißt, dass durch den physikalischen Scherstress rund drei Prozent des Proteins während der Diafiltration präzipitiert waren.

#### 7.5.4.2. Stabilität von Daclizumab während Einfrierzyklen in der KVS-Anlage

Während der Einfrier- und Auftauzyklen in der KVS-Temperieranlage zeigte der Antikörper eine sehr hohe Stabilität. Die Ergebnisse der SE-HPLC und Lichtblockade Messung gaben keine Hinweise auf einen nennenswerten Produktverlust (Tabelle III-26). Lediglich nach dem fünften Zyklus ist ein geringfügiger Anstieg der Partikelzahlen erkennbar.

**Tabelle III-26**

*Aggregation und Präzipitation von Daclizumab während wiederholter Einfrier- und Auftauzyklen in der KVS-Temperieranlage*

Probenbezeichnung	SE-HPLC Flächen-% Monomer	Anzahl Partikel je mL		
		> 1 µm	> 10 µm	> 25 µm
Probe Z0 Cont. I	99.77	409	12	1
Probe Z0 Cont. II	99.81	441	10	0
Probe Z1 Cont. I	99.73	2431	16	1
Probe Z1 Cont. II	99.83	2036	12	0
Probe Z3 Cont. I	99.79	4299	18	2
Probe Z3 Cont. II	99.77	4116	18	1
Probe Z5 Cont. I	99.79	17116	86	3
Probe Z5 Cont. II	99.76	13446	78	7

#### 7.5.5. Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse des Scale Up bestätigen die erfolgreiche Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung für den Antikörper Daclizumab. Durch die Wahl eines geeigneten Puffersystems, das kein Absinken des pH-Wertes während des Einfrierprozesses aufweist, konnte eine Aggregation des Antikörpers verhindert werden. Das auch im Drug Product enthaltene Tensid (0.02% Polysorbat 80) kann, wenn es bereits auf der Stufe des Bulk Products zugesetzt wird, als potenter Stabilisator gegen die Präzipitation des Proteins verwendet werden.



## 7.6. Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität von Daclizumab

Eine Fülle an Literaturstellen beschreibt Cryokonzentrationsphänomene und auch die Proteinkonzentration in einer Lösung als stabilitätsbeeinflussende Faktoren während der Einfrierprozesse [4, 14, 21, 85, 99-101]. Auch in dieser Arbeit wurde versucht, Parameter zu erkennen, die diese Cryokonzentration – insbesondere des Proteins – beeinflussen können. Eine Probenahme aus der noch gefrorenen Proteinlösung stellte sich als außerordentlich schwierig heraus (Kapitel III.2). Außerdem zeigten die zu Beginn der Arbeit verwendeten Proteinlösungen (Interferon alfa-2a, pegyliertes Interferon alfa-2a, Trastuzumab) keine Anhaltspunkte für nennenswerte Instabilitäten nach Einfrierzyklen im Integrated Biosystems CryoWedge<sup>TM</sup>. Die Stabilitätsdaten des Antikörpers Daclizumab im unvorteilhaften PBS-Puffer machten eine Probenahme aus der worst case Zone äußerst interessant. Insbesondere die Frage, ob in dem Bereich mit der höchsten Proteinkonzentration eine Zunahme von Oligomeren mittels SE-HPLC nachweisbar wäre, sollte geklärt werden. Durch Entwicklung einer Methode, noch im gefrorenem Zustand Proben zu entnehmen, ohne hierbei das Protein zu schädigen, war dies möglich.

In dem PBS-Puffersystem sollte neben dem Einfluss der Cryokonzentrationsprozesse auf die Proteinstabilität auch der Effekt der Proteinkonzentration der Ausgangslösung untersucht werden. Die Bildung von Abbauprodukten war also gewünscht, da nur so Unterschiede zwischen diesem worst case Bereich und dem Rest der Proteinlösung erkannt werden konnten. Die Probenahme aus dem worst case Bereich wurde nur nach dem 1. Zyklus durchgeführt. Nur so konnte eine Überlagerung durch andere Effekte ausgeschlossen werden, da zwischen den einzelnen Einfrierzyklen das Produkt infolge des Auftauvorgangs durchmischt und homogenisiert wird.

### 7.6.1. Versuchsdurchführung und Probenahme

Als Ausgangsprodukt diente eine Proteinlösung von 6.3 mg/mL Daclizumab in PBS-Puffer. Diese Lösung wurde mit der entsprechenden Menge PBS-Puffer verdünnt bis die gewünschte Konzentration (1.0, 2.5 und 5 mg/mL) Protein erreicht war und anschließend filtriert (0.2 µm). Die Versuche wurden im 20-Zoll Integrated Biosystems CryoWedge<sup>TM</sup> durchgeführt. Nach einem regulären Einfrierprozess wurde die Kühlmitteltemperatur langsam bis knapp unterhalb des Gefrierpunkts der Lösung erhöht. Da im worst case Bereich eine höhere Konzentration der Lösungsbestandteil und somit ein niedrigerer Schmelzpunkt vorzufinden war, bildete sich dort eine Art „Matsch“, also eine Mischung aus Eiskristallen und flüssigen

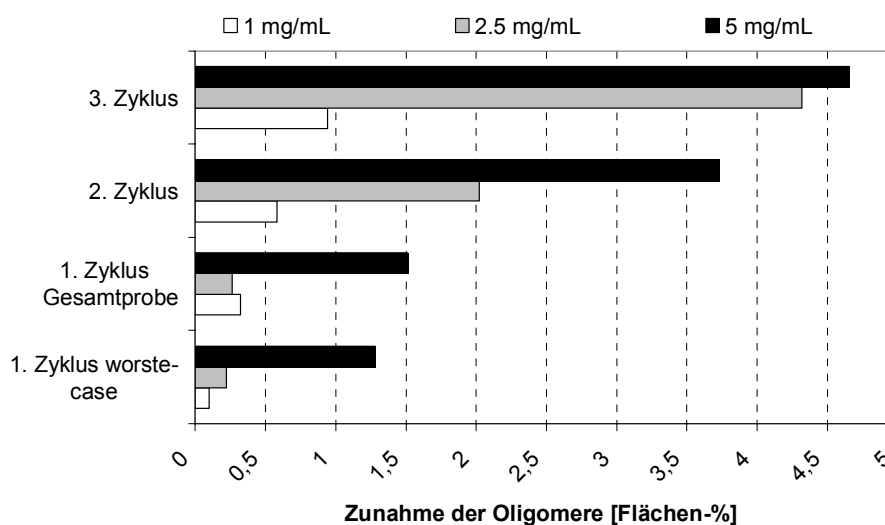
Anteilen. Die Viskosität der Probe war hoch genug, um eine unwillkürliche Verdünnung der **worst case Probe** mit peripheren Anteilen zu verhindern. Mit Hilfe eines Spatels (Spateldurchmesser 0.3 cm) wurde eine Probe mit 0.5 cm Durchmesser herauspräpariert. Der Rest der Lösung wurde anschließend bei +15°C aufgetaut, erneut Proben gezogen (**Gesamtprobe**) und zwei weiteren Einfrierzyklen unterworfen. Die Proben wurden hinsichtlich Proteinkonzentration (OD280), Aggregation (SE-HPLC) und Präzipitation (Licht-Blockade) ausgewertet. Da das Probenvolumen aus dem worst case Bereich nur ca. 1 mL Lösung betrug, musste für die Partikelmessung eine 1:10 Verdünnung im Probenpuffer durchgeführt werden.

### 7.6.2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der SE-HPLC sind in Abbildung III-48 dargestellt. Es ist sehr deutlich zu sehen, dass mit jedem weiteren Einfrier- und Auftauzyklus der Anteil an aggregiertem Protein weiter zunimmt. Des Weiteren ist ein deutlicher Effekt der Ausgangskonzentration des Proteins auf die Stabilität erkennbar. Je höher die Konzentration des Proteins in der Lösung ist, umso höher ist der Anteil an aggregiertem Protein. Allerdings unterscheidet sich der worst case Bereich nicht auffällig von der Probe der Gesamtlösung. Die stabilitätsbeeinflussenden Faktoren müssen also auch außerhalb der worst case Zone in gleichem Masse eintreten.

### Abbildung III-48

*Aggregation von Daclizumab im 20-Zoll CryoWedge<sup>TM</sup>. Im vermeintlichen worst case Bereich ist kein höherer Anteil an aggregiertem Protein nachweisbar.*



Die Ergebnisse der Partikelmessung bestätigen den Trend der Größenausschlusschromatographie. Insbesondere der Anteil an großen Partikeln ( $>10\ \mu\text{m}$ ) nimmt bei höherer Proteinkonzentration (Tabelle III-27) und mit Anzahl an Einfrierzyklen zu.

**Tabelle III-27**

*Verlauf der Partikelbildung*

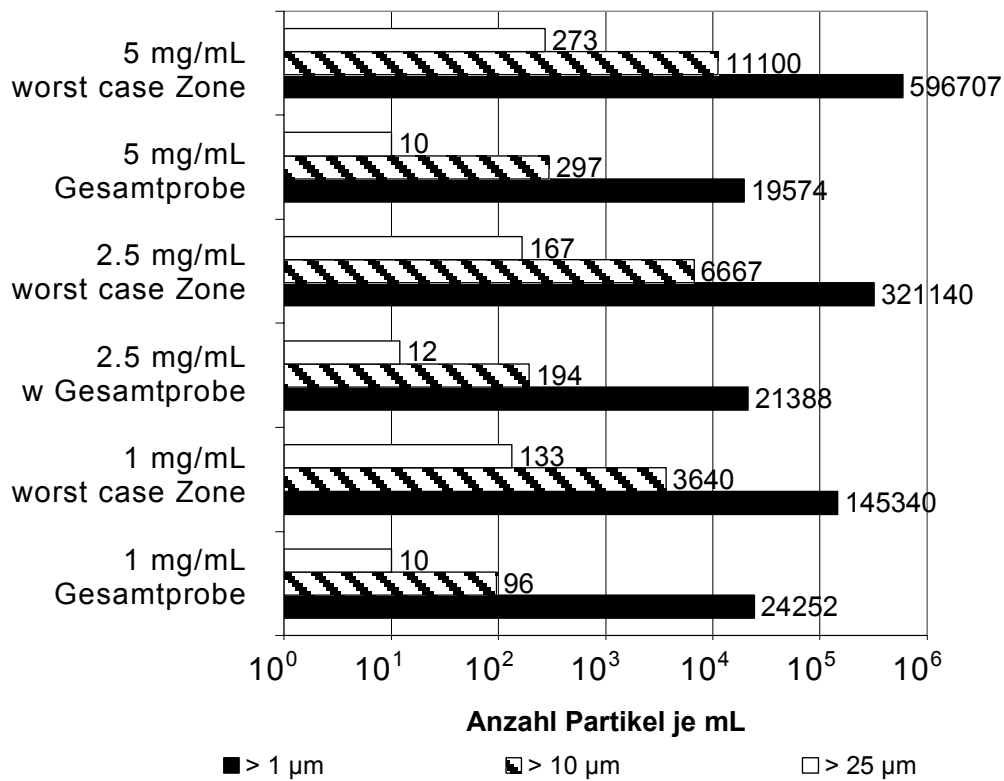
	1. Zyklus			2. Zyklus			3. Zyklus		
	$> 1\mu\text{m}$	$> 10\mu\text{m}$	$> 25\mu\text{m}$	$> 1\mu\text{m}$	$> 10\mu\text{m}$	$> 25\mu\text{m}$	$> 1\mu\text{m}$	$> 10\mu\text{m}$	$> 25\mu\text{m}$
<b>1 mg/mL</b>	24252	96	10	18596	168	15	22221	459	28
<b>2.5 mg/mL</b>	21388	194	12	19513	680	39	55207	1012	42
<b>5 mg/mL</b>	19574	297	10	39692	817	22	53987	1732	93

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der Proben aus dem worst case Bereich (Abbildung III-13) bestätigten das bereits im Kapitel III.2 beschriebene Phänomen, dass bei höherer Proteinkonzentration der prozentuale Anstieg infolge der Cryokonzentration leicht abnimmt. Die Stabilitätsdaten zeigten einen, zu den Cryokonzentrations- und pH-shift Effekten (Kapitel III.2, Abbildung III-13) auf den ersten Blick widersprüchlichen Trend: Aufgrund der Cryokonzentrationsprozesse, denen auch der Puffer unterliegt, war zu erwarten, dass das leichter lösliche  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  stärker aufkonzentriert wird, als  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Dies hätte zur Folge, dass der pH-shift in diesem Bereich etwas stärker auftreten würde, als im Rest der Lösung. Die Probe aus dem worst case Bereich bestätigte auch diese Vermutung. Nach dem Auftauen der Probe war wies diese einen mit pH 6.5 um 0.5 Einheiten niedrigeren pH auf als die Gesamtlösung (pH 7.0). Trotzdem waren mittels SE-HPLC keinerlei Anzeichen für eine erhöhte Aggregationstendenz in der worst case Bereich Zone nachweisbar (Abbildung III-48).

Allerdings wiesen diese Proben bereits mit bloßem Auge eine leichte Trübung auf. Die Messungen der Partikelzahlen bestätigten diese Beobachtung eindeutig. In dem aufkonzentrierten Bereich in der Mitte des CryoWedge<sup>TM</sup> ist eine sehr hohe Anzahl an Partikeln messbar, bei höherer Proteinkonzentration wird der Effekt deutlich verstärkt (Abbildung III-49).

**Abbildung III-49**

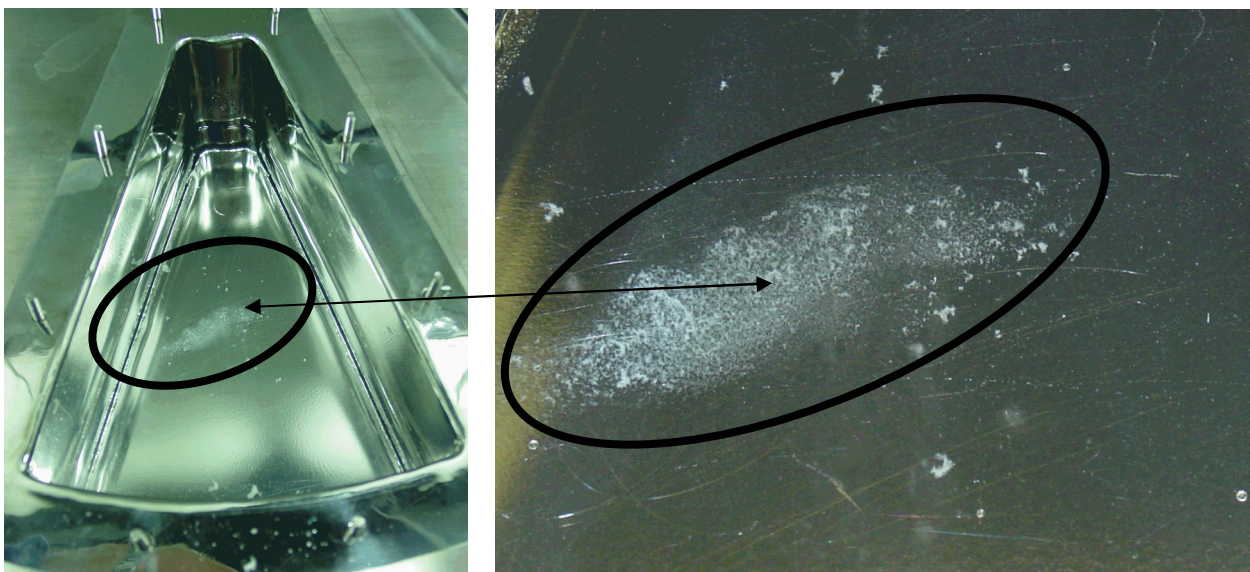
*Partikelbildung in Daclizumab Bulklösung: Vergleich der Partikelzahlen zwischen Gesamtprobe und worst case Probe.*



Nach dem Auftauen der gesamten Lösung zeigte sich, dass im Bereich der worst case Zone mit dem bloßen Auge unlösliche Partikel erkennbar waren (**Abbildung III-50**).

**Abbildung III-50**

*Schwebeteilchen im 20 Zoll CryoWedge™*



### 7.6.3. Diskussion

Obwohl verschiedene Literaturstellen [85, 99-101] darauf hinweisen, dass durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration der Bulklösung eine prozentuale Abnahme an aggregiertem Protein zu erwarten ist, konnten die vorliegenden Ergebnisse diese These auf den ersten Blick nicht stützen. Daclizumab zeigt eine prozentuale Zunahme des dimerisierten Proteins bei höherer Ausgangskonzentration der Proteinklösung. Während des Einfrierprozesses kommt es zu einer Aufkonzentrierung des Proteins in der nicht gefrorenen Lösung. Die Konzentration in dem worst case Bereich erreicht allerdings bei einer Ausgangskonzentration von 1 und 2.5 mg/mL Protein (Kapitel III.2, Abbildung III-13) keine so hohen Werte (3.8 mg/mL bzw. 7.8 mg/mL), die eine Präzipitierung infolge einer Unterschreitung der Löslichkeit des Antikörpers begründen. Trotzdem weisen die hohen Partikelzahlen in diesem Bereich darauf hin, dass ein höherer Anteil des Proteins genau in dieser konzentrierten Lösung ausfällt. Die Lichtblockade Messung quantifiziert die absolute Anzahl und Größe der ungelösten Teilchen. Die Proben unterscheiden sich insbesondere im Größenbereich zwischen 10 und 25  $\mu\text{m}$ . Führt man eine semiquantitative Analyse dieses Größenbereichs durch und nimmt an, dass alle Partikel eine Größe von ca. 10  $\mu\text{m}$  besitzen, so stellt man fest, dass mit Zunahme der Konzentration von 1 auf 2.5 und 5 mg/mL der prozentuale Anteil an präzipitiertem Protein nicht gleich bleibt, sondern um den Faktor 3.3 (2.5 mg/mL) bzw. 6.9 (5 mg/mL) zunimmt.

Es ist somit festzuhalten, dass der worst case Bereich für Qualitätsverluste des Antikörpers verantwortlich ist. Dies äußert sich im untersuchten Falle nicht einer verstärkten Dimerisierung, sondern Präzipitierung des Proteins. Der Anteil an Dimeren ist hingegen sogar etwas geringer als in der Gesamtprobe. Somit bestätigen diese Ergebnisse, die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [4, 14, 21, 85, 99, 101], die ähnliche Effekte beobachteten, allerdings nicht die Menge an präzipitiertem Protein quantifizierten.

An dieser Stelle sollen folgende theoretische Betrachtungen des Einfrierprozesses und der daraus resultierenden Cryokonzentrationsprozesse in Erwägung gezogen werden:

Da es während des Einfrierprozesses zu einer Kristallisation von Eis und Salzen kommt, sind Konzentrationsphänomene auf mikroskopischer Ebene auch in den Bereich zu erwarten, die bei makroskopischer Probenahme keine erhöhte Konzentration aufweisen. Es kommt jedoch infolge des Eiskristallwachstums zu einer Ausbildung hochkonzentrierter Lösungsanteilen, bis infolge der Überschreitung des Lösungsproduktes, auch die Salze auskristallisieren. Ein Teil wird auch im amorphen Zustand zwischen den Eiskristallen erstarren. Das heißt auch in diesen Bereichen ist das Protein vorübergehend einer hohen Elektrolyt- und auch

Proteinkonzentration ausgesetzt. Ähnliches ist auch im worst case Bereich in der Mitte des CryoWedge<sup>TM</sup> zu erwarten. Allerdings ist hier die Anfangskonzentration durch die bereits stattgefundene Aufkonzentrierung etwas höher. Welches Ausmaß diese mikroskopischen Konzentrationseffekte haben, sind auf dem von uns untersuchten makroskopischen Weg nicht zu bestimmen. Somit sind Proteine nicht nur in diesem worst case Bereich, der ja nur einen Bruchteil des enthalten Proteins betrifft, diesem Konzentrationseffekt ausgesetzt, sondern in der gesamten Lösung. Allerdings legt die Tatsache, dass in diesem Bereich die Anzahl an Partikel um den Faktor dreißig gegenüber der Gesamtprobe erhöht war, die Vermutung nahe, dass dort vor allem die Präzipitation des Proteins stattfindet ist. Ein Grund hierfür könnte in der höheren Salzkonzentration in diesem Bereich liegen. Insbesondere der Natriumphosphatpuffer besitzt eine geringe Löslichkeit und kristallisiert aus. Das Protein ist dadurch während des Einfrierprozesses einer größeren Interaktionsfläche zu den Salzkristallen ausgesetzt. Diese Interaktion könnte, ähnlich wie dies für andere Grenzflächenphänomene gilt, zu der erhöhten Präzipitatbildung führen.

Ein ähnlicher Effekt könnte für die Ergebnisse der SE-HPLC verantwortlich sein. Die Erhöhung der Elektrolytkonzentration könnte eine Stabilisierung des Proteins gegenüber einer pH-Wert induzierten Denaturierung und Aggregation bewirken. Die Auswirkungen von Elektrolytkonzentration auf die Proteinestabilität sind äußerst komplex und abhängig vom Typ und Konzentration des Ions [121, 122, 123, 124]. Für eine Klärung des hier beobachteten Phänomens wären weitergehende Versuche notwendig.

### 7.7. Zusammenfassung

Die Ergebnisse Stabilitätsuntersuchungen von Daclizumab zeigen, dass der Antikörper durch Einfrierstress zweierlei Instabilitäten in den untersuchen Puffern zeigt. Während die Oligomerbildung durch einen pH-shift des Natriumdiphosphatpuffers von 7 auf 3 ausgelöst wird, ist im Basischen die Präzipitierung des Antikörpers zu beobachten.

Durch Wechsel des Puffermediums von Natrium- auf Kaliumphosphatpuffer kann die Bildung löslicher Aggregate quantitativ unterbunden werden. Ein vergleichbarer Effekt ist durch den Zusatz von Disacchariden (Trehalose, Saccharose) erzielbar. Der Mechanismus der Stabilisierung kann mittels preferential exclusion, also einer thermodynamischen Stabilisierung des nativen Zustands des Proteins, erklärt werden. Um eine hohe Stabilität des Proteins zu gewährleisten, sind je nach Zuckerart, verschiedene minimale Konzentrationen des Hilfsstoffes notwendig.

Die Bildung von unlöslichen Schwebeteilchen ist durch die Verwendung eines nichtionischen Tensids möglich. Es bestätigte sich die Beobachtung von Chang et al [100], dass durch Zugabe von Polysorbat 80 eine Vermeidung von Präzipitatbildung möglich ist. Chang zeigte einen Zusammenhang zwischen der Trübung von verschiedenen Proteinen (Phosphofructokinase, Lactatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und Interleukin-1 Rezeptorantagonist) während wiederholter Einfrier- und Auftauzyklen und der Gegenwart von Tensiden. Da die Proteine unter Einfluss von Grenzflächeneffekten eine sehr ähnliche Stabilität aufwiesen, gehen die Autoren davon aus, dass die Partikelbildung des Proteins auch während des Einfrierens durch Grenzflächenphänomene ausgelöst wird. Das Protein ist einer größeren Grenzfläche zu den Eiskristalle hin ausgesetzt und präzipitiert. Durch Zugabe von Tensiden können derartige Instabilitäten reduziert werden.

Auch die Anpassung des pH-Wertes kann hierbei hilfreich sein. Der Grund für die Präzipitation des Antikörpers ist zum einen in der Annäherung des pH-Wertes an den isoelektrischen Punkt des Proteins und daher mit einer verringerten Löslichkeit zu erklären. Puffermedien, die eine Erhöhung des pH-Wertes während dem Einfriervorgang aufweisen, verstärken die Partikelbildung. Zum anderen ist der Antikörper während dem Einfrierstress auch dem Grenzflächenstress Protein / Eiskristalle ausgesetzt. Eine Kombination dieser beiden Faktoren sollte für die nachweisbaren Trübungserscheinungen verantwortlich sein.

Die Untersuchung des aufkonzentrierten Produktanteils im CryoWedge<sup>TM</sup> zeigt sehr deutlich, dass vor allem im worst case Bereich mit einer Präzipitation des Proteins zu rechnen ist. Da in dieser worst case Zone die Konzentration des Proteins um den Faktor 4-5 erhöht ist, zeigen sich deutliche Trübungserscheinungen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit der Dimer- oder Oligomerisierung gebracht werden.

Das Scale Up des Einfrierverfahrens aus dem Labormaßstab in die großindustrielle Produktionsanlage stellt den Abschluss dieser Untersuchung dar. Trotz hoher Proteinkonzentration (15 mg/mL) und der in der KVS-Temperieranlage zu erwartenden physikalischen Scherkräfte wurde in der optimalen Rezeptur eine hohe Stabilität des Antikörpers beobachtet. Die Präzipitation des Antikörpers während der Umpufferung zeigt die, auch aus dem Aufreinigungsprozess bekannte, Anfälligkeit gegenüber Scherkräften.

Die vorliegenden Ergebnisse legen also die Vermutung nahe, dass die im PBS-Puffer beobachtete Instabilität nicht ein Effekt einer Kältedenaturierung im engeren Sinne, sondern durch Veränderungen des Puffermediums bzw. Grenzflächenphänomene infolge der Eiskristallisation sind.

## **IV. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von Stressfaktoren während des Einfrierens und Auftauens von Proteinlösungen in großindustriellen Einfrieranlagen. Hierbei sollten zwei sehr unterschiedliche Einfriersysteme näher untersucht und die darin auftretenden Stressfaktoren ermittelt werden. Im Mittelpunkt stand die erstmalige Inbetriebnahme und Charakterisierung der völlig neuartigen KVS-Temperieranlage, einem Prototypen, der aufgrund der permanenten Produktdurchmischung während des Prozesses mit einer neuartigen Einfriertechnik arbeitet. Den Abschluss der Arbeit bildete die Entwicklung einer einfrierstabilen Formulierung für einen monoklonalen Antikörper mit anschließendem Scale Up in den industriellen Maßstab.

### **Qualifizierung der KVS-Temperieranlage**

Die KVS-Temperieranlage stellt ein neuartiges System zu Einfrieren und Auftauen von Proteinlösungen im Großmaßstab dar. Durch die permanente oszillierende Drehbewegung während des Prozesses und dem Kältemedium flüssigen Stickstoff sind sehr kurze Prozesszeiten erreichbar. Die KVS-Anlage konnte erfolgreich qualifiziert und ein Konzept zum routinemäßigen Einsatz entwickelt werden. Im Rahmen der PQ wurden die entwickelten Rezepte, die auf der genauen Kenntnis der Einfrier- und Auftaukinetik beruhen, erfolgreich verifiziert werden.

### **Stressfaktoren in der KVS-Temperieranlage**

Die Stabilität von vier verschiedenen Proteinlösungen wurde während wiederholter Einfrierzyklen in der KVS-Temperieranlage untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass mittels der KVS-Temperieranlage zum Einen eine sehr hohe Abkühlgeschwindigkeit möglich ist, zum Anderen jedoch, dass der Prozess mit zusätzlichen Stressfaktoren für das Protein verbunden sein kann.

Bei der permanenten Homogenisierung während des Einfrierprozesses kommt es zu einer deutlichen Aufkonzentrierung der Lösungsbestandteile um bis zu 500 %. Es konnte gezeigt werden, dass zu Beginn des Einfrierprozesses eine deutlich verdünnte Lösung (nur 80 % der Ausgangskonzentration) auskristallisiert. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung der Lösungsbestandteile. Ein Volumenbereich von ca. 15-20 % friert bei erhöhter Proteinkonzentration ein. Allerdings ist die Quantifizierung der hierbei



auftretenden Cryokonzentration sehr aufwändig und schwierig, da die unregelmäßige Form des gefrorenen Produktes eine gezielte Probenahme erschwert.

Ein weiterer Stressfaktor sind Interaktionen der Proteinlösung mit dem Headspace des Produktbehälters. Proteine, die zur surface-induced aggregation neigen, können Abbaureaktionen zeigen. Im Falle von Interferon konnte keine Aggregation mittels SE-HPLC festgestellt werden, allerdings waren sehr hohe Zahlen an un- oder schwerlöslichen Partikeln nachweisbar. Der Grund dafür, dass Interferon keinen auffälligen Befund in der Gelfiltrationschromatographie zeigte, könnte in der labilen Natur der entstandenen Präzipitate zu finden sein. Durch die während der SE-HPLC herrschenden Drücke könnten sich die Interferon Assoziate wieder auflösen.

Im Falle des pegylierten Interferons war hingegen keine Partikelbildung festzustellen. Allerdings führte die Interaktion mit dem Headspace zur Bildung von großen Mengen an Schaum. Peginterferon besteht aus einem hydrophoben Protein- und einem hydrophilen, verzweigten PEG-Rest und neigt daher noch mehr als andere Proteine zur Schaumbildung. Die Analyse des entstandenen Schaums zeigte einen deutlichen Anstieg von Oligo-Peginterferon und Peginterferon Aggregaten. Ursache hierfür könnte die Neubildung von Aggregaten sein. Allerdings ist es ebenfalls denkbar, dass es lediglich zu einer Akkumulation von Oligo-Peginterferon und aggregiertem Peginterferon im Schaumüberstand kommt. Im Falle des Oligo-Peginterferon scheint letzte Möglichkeit zutreffend zu sein, da die Bildung von Oligo-Peginterferon eine nukleophile Substitution ist und somit nicht durch den Einfrierprozess verursacht werden kann.

Die Ergebnisse zeigen zudem sehr deutlich, dass das Ausmaß an Stressfaktoren mit dem Befüllvolumen der Edelstahlbehälter zunimmt. Während Interferon bei geringem Befüllvolumen keine Instabilitäten aufwies, war bei Maximalbeladung eine deutliche Präzipitation des Proteins erkennbar. Mit höherem Befüllvolumen nehmen auch Prozesszeit, Scherstress und Cryokonzentrationseffekte zu. Diese Faktoren können nicht getrennt von einander betrachtet werden, da sie sich zum Teil gegenseitig beeinflussen und bedingen.

### **Untersuchung der Cryokonzentrationseffekte**

Ein Vergleich des in der Literatur häufig beschriebene Stressfaktors Cryokonzentration in den konzeptionell unterschiedlichen Einfriersystemen Integrated Biosystems und KVS-Temperieranlage erscheint sehr schwierig. Die höchsten Cryokonzentrationseffekte konnten im CryoWedge<sup>TM</sup> gefunden werden. Allerdings lassen sich durch die Art des Einfrierprozesses die höchstkonzentrierten Produktanteile genau ermitteln und durch gezielte Probenahme untersuchen. Die hier vorgestellten Ergebnisse der Cryokonzentration im CryoWedge<sup>TM</sup> umfassen nur 0.5 % des Gesamtvolumens der Produktlösung. Vergleicht man die Konzentrationswerte von Interferon Bulklösung, die zu Beginn in beiden Einfriersystemen erstarren, so stellt man fest, dass diese im CryoWedge<sup>TM</sup> nur geringfügig (ca. 5%) von der Ausgangskonzentration abweichen. In der KVS-Anlage waren dies immerhin 20%. Dies legt die Vermutung nahe, dass im CryoWedge<sup>TM</sup> nur ein sehr kleines Volumen an Produktlösung einem signifikanten Cryokonzentrationsprozess ausgesetzt ist, während der überwiegende Teil bei normaler Konzentration einfriert. In der KVS-Anlage hingegen scheint sich ein deutlicherer Konzentrationsgradient über die gesamte Produktlösung zu erstrecken.

Allerdings handelt es sich bei diesen Beobachtungen um makroskopisch erkennbare Effekte. Wie das Beispiel der Bildung von Eutektika zeigt, findet auf mikroskopischer Ebene auch im kleinsten Volumen eine Cryokonzentration statt. Wasser kristallisiert bevorzugt in reinen Eiskristallen aus, während eine hochkonzentrierte Salzlösung zurückbleibt. Nach Unterschreitung des Lösungsproduktes des gelösten Salzes findet auch eine Abscheidung von Salzkristallen neben den Eiskristallen statt. Die Prozesse sind auch in den Bereichen der Proteinlösung zu erwarten, die makroskopisch keine Aufkonzentrierung zeigen. Es kommt zur so genannten „amorphous phase freeze concentration“, d. h. das Protein erstarrt bei hoher Elektrolyt und Proteinkonzentration im glasartigen Zustand.

### **Beeinflussung von Cryokonzentrationseffekten im CryoWedge<sup>TM</sup>**

Eine absolute Vermeidung des Phänomens Cryokonzentration ist auch im CryoWedge<sup>TM</sup> nicht möglich. Die Untersuchung der Cryokonzentrationsphänomene konnten jedoch einen direkten Zusammenhang der Proteinkonzentration einer Lösung und dem Faktor der Aufkonzentrierung nachweisen. Mit steigender Proteinkonzentration kann eine

prozentuale Reduktion der Cryokonzentrationseffekte erzielt werden. Die Verwendung von Polysorbat 20 oder Trehalose hingegen hatte nur vernachlässigbare Auswirkungen.

### **Stabilitätsuntersuchungen in der KVS-Temperieranlage**

Neben den kritisch zu bewertenden Stabilitätsdaten von Peginterferon in der KVS-Anlage zeigen die Beispiele der beiden untersuchten Antikörper Bulklösungen und des Interferons, dass die KVS-Anlage bei Wahl einer geeigneten Bulkformulierung sehr gut für das Einfrieren und Auftauen von Proteinlösungen im Großmaßstab geeignet ist.

Das Problem der Präzipitatbildung von Interferon konnte durch geringfügige Änderungen des pH-Wertes um 0.5 Einheiten gelöst werden. Die Stabilitätsdaten der beiden Antikörper Daclizumab und Trastuzumab bestätigten ebenfalls, dass durch Wahl eines geeigneten Puffermediums und dem gezielten Einsatz von Cryoprotektiva eine hohe Produktstabilität gewährleistet werden kann.

### **Stabilitätsuntersuchungen im CryoWedge™**

Die Stabilitätsstudien von Interferon, Peginterferon und Trastuzumab belegen produktschonende Einfrier- und Auftauprozesse im CryoWedge™. Allerdings ist zu beachten, dass es sich hierbei um ein Scale Down System handelt, die Versuchsbedingungen sollen also den großindustriellen Maßstab simulieren. Ob die Ergebnisse in Wirklichkeit mit den Stabilitätsdaten der 120 L fassenden CryoVessel™ vollkommen übereinstimmen, konnte aufgrund mangelnder Verfügbarkeit der Großanlage und den für diese Versuche notwendigen Volumina an Proteinlösungen nicht geklärt werden.

Die Stabilitätsuntersuchungen von Daclizumab in der noch nicht optimierten Formulierung zeigen jedoch, dass auch dieses System nicht in der Lage ist, Instabilitäten, die aus einer ungeeigneten Formulierung resultieren, zu kompensieren.

### **Einfluss der Cryokonzentrationseffekte auf die Proteinstabilität**

Es ist schwierig zu klären, ob die zu beobachtenden Cryokonzentrationseffekte einen Einfluss auf die Proteinstabilität haben. Die Daten der Stabilitätsuntersuchung von Daclizumab wiesen zweierlei Tendenzen auf:

Zum Einen nahm mit steigender Proteinkonzentration der Bulklösung auch das Ausmaß der Aggregation zu. Eine hohe Proteinkonzentration hatte einen negativen Einfluss auf die Stabilität.

Zum Anderen war im **worst case Bereich des CryoWedge™**, also dem Bereich wo auch eine deutlich höhere Proteinkonzentration infolge der Einfrierprozesse nachweisbar ist, der **Anteil an dimerisiertem Protein etwas niedriger als in der gesamten Lösung**. Zwei Tendenzen, die sich auf den ersten Blick widersprechen.

Darüber hinaus ist im worst case Bereich des CryoWedge™ der pH-shift des Natriumphosphatpuffers noch deutlicher ausgeprägt. Dies sollte die Stabilität des Proteins zusätzlich beeinträchtigen.

Allerdings kommt es im worst case Bereich nicht nur zu einer Aufkonzentrierung des Proteins, sondern auch der anderen Lösungsbestandteile. Diese wiederum können bei erhöhter Konzentration zu einer Stabilisierung des Antikörpers beitragen.

Die Quantifizierung von präzipitiertem Protein mittels Licht-Blockade-Messung zeigte in den vorliegenden Untersuchungen nur eine teilweise Bestätigung der SE-HPLC Daten.

Bei erhöhter Proteinkonzentration nahm zum einen der prozentuale Anteil an präzipitiertem Protein deutlich zu. Der **worst case Bereich** des CryoWedge™, der einen geringeren Anteil an Dimeren enthielt, wies hierbei eine **signifikant erhöhte Anzahl an unlöslichen Partikeln** auf. Infolge der Cryokonzentration der gelösten Salze kommt es während des Einfrierprozesses zu einer verstärkten Auskristallisation des Natriumphosphatpuffers. Das Protein ist in diesem Bereich einer großen Kristalloberfläche ausgesetzt, die zur Präzipitation des Proteins führen kann. Als potenter Inhibitor der Präzipitation erwies sich der Zusatz eines nichtionischen Tensids (Polysorbat 80). Auch Veränderungen des pH-Wertes konnten eine Stabilisierung des Proteins bewirken.

### **Stabilisierung von Proteinlösungen mittels Hilfsstoffen**

Die vorliegenden Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Daclizumab unter Zusatz von Polysorbat 80 bzw. von nicht reduzierenden Disacchariden deuten auf einen unterschiedlichen Bildungsmechanismus für lösliche (Dimere, Oligomere) und unlösliche (hochmolekulare Präzipitate) hin. Konnte durch die Verwendung eines Disaccharids die, durch den pH-shift des Natriumphosphat Puffers verursachte Aggregation verhindert werden, so hatte Polysorbat 80 bis zu einer Konzentration von 0.02 % keinerlei Einfluss darauf.

Der gegenteilige Effekt wurde in Bezug auf die Präzipitation des Antikörpers beobachtet. Während in Gegenwart des Disaccharids weiterhin hohe Partikelwerte zu verzeichnen waren, unterband Polysorbat 80 die Präzipitatbildung.

---

Die besten Ergebnisse wurden durch Kombination von Disaccharid und Tensid oder bei Verwendung eines nicht zum pH-shift neigenden Puffers (Beispiel: Kaliumphosphat) unter Zusatz von Tensid erreicht.

Im Falle des Daclizumab erschien die zuletzt genannte Möglichkeit als eleganteste Lösung, da kein stabilisierender Hilfsstoff zugegeben werden muss, sondern der für die Stabilität ungünstige pH-Bereich gemieden wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wahl einer geeigneten Formulierung der Garant für eine hohe Stabilität des Proteins ist. Unter diesen Umständen können die Einflüsse der verwendeten Einfriermethode weitgehend reduziert werden. Zudem spielt der Kostenfaktor eine bedeutende Rolle und muss bei der Auswahl des Systems in Betracht gezogen werden. Immerhin ist bei der Beschaffung der Integrated Biosystems Anlage mit dem zehnfachen Investitionsvolumen als bei der KVS-Temperieranlage zu rechnen.

## V. Literaturverzeichnis

- [1] Ahmad, F., Bielow, C. "Thermodynamic stability of proteins in salt solutions: A comparison of effectiveness of protein stabilizers" J. Protein. Chem. 5, 353-367, 1986
- [2] Arakawa, T., Timasheff, S. "Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions". Biochemistry 21, 6545-6552, 1982
- [3] Arakawa, T., Timasheff, S. N., "Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts". Biochemistry 23, 5924, 1984
- [4] Avinov, A., "Biological antifreezes and the mechanism of their activity". Mol. Biol. 24, 473-487, 1980
- [5] Gooley, P. R., Plaisted, S. M., Brems, D. N., MacKenzie, N. E., "Determination of local conformational stability in fragment 96-133 of bovine growth hormone by high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy". Biochemistry 27, 4541-4546, 1988
- [6] Carpenter, J., Crowe, J., "The mechanisms of cryoprotection of proteins by solutes. Cryobiology". 25, 244-255, 1988
- [7] Carpenter, J., Hansen, T., "Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: Mediation through influence on ice crystal growth". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8953-8957, 1992
- [8] Carpenter, J., Arakawa, T. Crowe, J., "Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying". Dev. Biol. Standard, 74, 225-239, 1991
- [9] Christensen, H., and Pain, R. H., "Molten globule intermediates and protein folding". Eur. Biophys. J. 19, 221-229, 1991
- [10] Cleland, J. L., and Wang, D. I. C., "Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase B: quasi-elastic light scattering analysis". Biochemistry 29, 11072-11078, 1990
- [11] Creighton, T. E., "Proteins: Structures and Molecular Properties". W. H. Freeman, New York, 1984
- [12] Dams, T., "Dihydrofolat Reduktase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*: Struktur, Funktion, Stabilität und Faltung", Dissertation, Universität Regensburg, 1998

- 
- [13] Davis, S., "Hydrodynamic interactions in directional solidification". J. Fluid Mech. 212, 241-262, 1990
- [14] DeVries, A., "Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes". Phil. Trans. R. Soc. Lond. B304, 575-588, 1984
- [15] Fennema, O., "Behaviour of proteins at low temperatures" In Food protein deteriorations: Mechanisms and functionality, edited by J. Cherry. Washington, DC: ACS Symposium Series 206, 109-133, 1982
- [16] Fersht, A., "Structure and mechanism in protein science". W. H. Freeman, New York, 508-539, 1999
- [17] Franks, F., "Solid aqueous solutions". Pure & Appl. Chem. 65, 2527-2537, 1993
- [18] Franks, F. et al., "The thermodynamics of protein stability: Cold destabilization as a general phenomenon". Biophys. Chem.. 31, 307-315, 1988
- [19] Franks F., Hatley R. H. M., Mathias S. F; "Material Science and the Production of Shelf –Stable Biologics"; Pharm. Technol. Int. 6, 24, 1991
- [20] Gölker C., „Gefriertrocknung biotechnologischer Produkte“, Pharm. Technol. J. 10, 30, 1989
- [21] Hew, C., and Yang, D., "Protein interaction with ice". Eur. J. Biochem. 203, 33-42. 1992
- [22] Hoffmann La-Roche AG, Fachinformation zu Roferon-A Injektionslösung, 1999
- [23] Holtzhauer, M., Behlke J., Kleinpeter, E., Kraft, R., Lassmann, G., Pfeil, W., Rohde K., Welfle, H. in „Methoden in der Proteinanalytik“, Springer-Verlag, 283-365, 1996
- [24] Integrated Biosystems, <http://www.integratedbio.com>
- [25] Kim, P. S., and Baldwin, R. L., "Intermediates in the folding reactions of small proteins". Ann. Rev. Biochem. 59, 631-660, 1990
- [26] Koerber, C., "Phenomena at the advancing ice-liquid interface: A molecular dynamics simulations study". J. Chem. Phys. 89, 6889-6896, 1988
- [27] Kuntz, I., Kauzmann, W., „Hydration of proteins and polypeptides“. Adv. Protein Chem. 28, 239-345, 1974

- [28] Kuwajima, K., "The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure". *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6, 87-103, 1989
- [29] Kyprianidou-Leonidou, T., Botsaris, G., "Freeze concentration of aqueous solutions" In "Crystallization as separation process", edited by Myerson, A., Toyokura, K., Washington, DC, American Chemical Society, 1990
- [30] Lehrman, S. R., Tuls, J. L., Havel, H. A., Haskell, R. J., Putnam, S. D., Tomich, C. S., "Site-directed mutagenesis to probe protein folding: evidence that the formation and aggregation of a bovine growth hormone folding intermediate are dissociable". *Biochemistry* 30, 5777-5784, 1991
- [31] Manning, M. C., Patel, K., Borchardt, R. T., "Stability of protein pharmaceuticals". *Pharm. Re.* 6, 903-918, 1989
- [32] Mielck, J. B. "Begriffsbestimmungen der Validierung" in *Praxis der Validierung* (Sucker, H.) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 17-29, 1983
- [33] Muecke, M., Schmid, F., „A kinetic method to evaluate the two-state character of solvent-induced protein denaturation“. *Biochemistry* 33, 12930-12935, 1994
- [34] Mummenthaler, M. „Sprüh-Gefriertrocknung bei Atmosphärendruck: Möglichkeiten und Grenzen in der Pharmazeutischen Technologie und in der Lebensmitteltechnologie“; Dissertation Universität Basel, 1990
- [35] Ohms, J., Hofmann LaRoche AG Basel "Recombinant Interferon-Alpha-2a: Utilizing folding intermediates for the prediction of the aggregation potential in pharmaceutical formulations", Manuscript No. B-156'356 for Publication in *Biochemistry*, 1992
- [36] Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C., Samuel, C. E., „Interferons and their actions“. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 727-777, 1987
- [37] Pikal, M. J., „Formulation and Delivery of Proteins and Peptides“ Chapter 8 ACS Symposium Series 567, 120-133, 1994
- [38] Pikal, M. J., "Mechanisms of Protein Stabilization During Freeze-Drying and Storage: The Relative Importance of Thermodynamic Stabilization and Glassy State Relaxation Dynamics" in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products* edited by Lois Rey and Joan C. May, Marcel Dekker, Inc., 1999



- 
- [39] Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V. Zerovnik, E., Razgulyaev, O. I., "Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding". FEBS Lett. 262, 20-24, 1990
- [40] Ptitsyn, O. B., „How does protein synthesis give rise to the 3D-structure?“. FEBS Lett. 285, 176-181, 1991
- [41] Rubinsky, B., Eto, T., "Heat transfer during freezing of biological materials". Ann. Rev. Heat Transfer 3, 1-38, 1990
- [42] Rubinsky, B., Lee, C., Chaw, M., "Experimental observations and theoretical studies on solidification processes in saline solutions". Experim. Thermal Fluid Sci. 6, 157-167, 1993
- [43] Skrabanja, A. T. P., De Meere A. L. J., De Ruiter R. A., Van de Oetelaar, P. J. M., "Lyophilization of Biotechnology Products", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 311-371, 1994
- [44] Shimoyamada, M. et al., "Freezing and eutectic points of an aqueous amino acid solution containing ethanol and the effect of ethanol addition on the freeze concentration process". Biotech. Biochem. 58, 836-838, 1994
- [45] Spicer, A., "Advances in preconcentration and dehydration of foods". Applied Science Publications, London, ed. 1984
- [46] Sucker, H., Fuchs, P., Speiser, P., „Validierung“ in Pharmazeutische Technologie, Thieme Verlag Stuttgart, 170-172, 1991
- [47] Tanford, C., „Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation". Adv. Protein Chem. 24, 1-95, 1970
- [48] Timasheff, S. N., "Preferential interactions in protein-water-cosolvent system". In Biophysics of Water (Franks, F. and Mathias, S.) Wiley, New York, 70-72, 1982
- [49] Volkin, D. B., Klibanov, A. M., "Protein function – a practical approach" (Ed. Creighton, T. E.), IRL Press, Oxford 1-24, 1989
- [50] Windsor, W. T., Syto, R., Le, H. V., Trotta, P. P., "Analysis of the conformation and stability of Escherichia coli derived recombinant human interleukin 4 by circular dichroism". Biochemistry 30, 1259-1264, 1991
- [51] Wisniewski, R., „Developing Large-Scale Cryopreservation Systems for Biopharmaceutical Products“, BioPharm 11 No. 6, 50-60, 1998

- [52] Wisniewski, R., "Large-Scale Cryopreservation of Cells, Cell Components, and Biological Solutions", *BioPharm* 11 No. 9, 42-50, 1998
- [53] Wisniewski, R., Wu, V. L., "Biotechnology an Biopharmaceutical Manufacturing, Processing, and Preservation", *Drug Manufacturing Technology Series Vol. 2*
- [54] Küster, F.W., Thiel, A.; Ruland, A.: *Rechentafeln für die chemische Analytik*, New York: de Gruyter, 1993
- [55] Koerber Ch., "Phenomena at the advancing ice-liquid interface: solutes, particles and biological cells". in *Quarterly Review of Biophysics* 21 (2), 229-298, 1988
- [56] Chang, B. S., Randall C. S., "Use of Subambient Thermal Analysis to Optimize Protein Lyophilization". *Cryobiology* 29, 632-656, 1992
- [57] Höhne, G., Hemminger W., Flammerheim, H. J., *Differential Scanning Calorimetry*, Springer-Verlag Berlin, 111-115, 1996
- [58] Sluzky, V., Tamady, J. Klibanov, A. M., Langer, R., "Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 9377, 1991
- [59] Loughheed, W. D., Albisser, A. M., Martindale, H. M., Chow, J. C., Clement, J. R., "Physical stability of insulin formulations". *Diabetes*, 32, 424, 1983
- [60] Thurow, H. Geisen, K., "Stabilization of dissolved proteins against denaturation at hydrophobic interfaces". *Diabetologia*, 27, 212, 1984
- [61] Sato, S., Ebert, C. D., Kim, S. W., "Prevention of insulin self-association and surface adsorption". *J. Pharm. Sci.*, 72, 228, 1984
- [62] Chawla, A. S., Hinberg, I., Blais, P., Johnson, D., "Aggregation of insulin, containing surfactants, in contact with different materials". *Diabetes*, 23, 420, 1985
- [63] Suelter , C. H., DeLuca, M., "How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic". *Anal. Biochem.*, 135, 112, 1983
- [64] Donaldson, T. T., Boonstra, E. F., Hammond, J. M., "Kinetics of protein denaturation at gas-liquid interfaces". *J. Colloid Interface Sci.*, 74, 441, 1980
- [65] Henson, A. F., Mitchell, J. R., Mussellwhite, P. R., "The surface coagulation of proteins during shaking". *J. Colloid Interface Sci.*, 32, 162, 1970

- 
- [66] Cartwright, T., Senussi, O., Grady, M. D., The mechanism of the inactivation of human fibroblast interferon by mechanical stress, *J. Gen. Virol.*, 36, 317, 1977
- [67] Virkar, P. D., Narendranathan, T. J., Hoare, M., Dunhill, P., "Studies of the effects of shear on globular proteins: extensions to high shear fields and to pumps". *Biotech. Bioeng.*, 23, 425, 1981
- [68] Brannan, J. R., Gebhart, S. P., Blackhard, W. G., "Pump-induced insulin aggregation: a problem with the biostator". *Diabetes*, 23, 353, 1985
- [69] Tandom, S., Horowitz, P. M., "Reversible folding of rhodanase". *J. Biol. Chem.*, 264, 9859, 1989
- [70] Cleland, J. L., Wang, D. I. C., "Cosolvent effects on refolding and aggregation, in *Biocatalysis Design for Stability and Specificity*". Himmel, M., Georgiou, G, Eds., ACS Symposium Series, Vol. 516, American Chemical Society, Washington, D. C., 1993, 151
- [71] Cleland, J. L., Randolph, T. W., "Mechanism of polyethylene glycol interaction with the molten globule intermediate of bovine carbonic anhydrase B". *J. Biol Chem.*, 267, 3147, 1992
- [72] Prestrelski, S. J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J. F., "Dehydration-induced conformation transitions in proteins and their inhibition by stabilizers". *Biophys. J.* 65, 661-671, 1993
- [73] Tanaka, K., Takeda, T., Miyajima, K., "Cryoprotective effects of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying". *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1091-1094, 1991
- [74] Kreilgaard, L., Frokjaer, S., Flink, J. M., Randolph, T. W., Carpenter, J. F., "Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freez-drying and storage in the dried solid". *Arch. Biochem. Biophys.*, 360, 121-1234, 1998
- [75] Allison, S. D., Manning, M. C., Randolph, T. W., Middleton, K., Davis, A., Carpenter, J. F., "Optimization of storage stability of lyophilized actin using combinations of disaccharides and dextran". *J. Pharm Sci.*, 89, 199-214, 2000
- [76] Duddu, S. P., Dal Monte, P. R., "Effect of glass transition temperature on the stability of lyophilized formulations containing a chimeric therapeutic monoclonal antibody". *Pharm. Res.*, 14, 591-595, 1997

- [77] Nielsen, K., "Stability of freeze dried horse-radish peroxidase conjugated monoclonal antibodies used in diagnostic serology". *J. Immunoassay*, 16, 183-197, 1995
- [78] Barbour, N. P., Paborji, M., Alexander, T. C., Coppola, W. P., Bogardus J. B., „Stabilization of chimeric BR96-doxorubicin immunoconjugate“. *Pharm. Res.*, 12, 215-222, 1995
- [79] Andya, J. D., Maa, Y. F., Costantino, H. R., Nguyen, P. A., Dasovich, N., Seeney, T. D., Hsu, C. C., Shire, S. J., "The effect of formulation excipients on protein stability and aerosol performance of spray-dried powders of a recombinant humanized anti-IgE nonoclonal antibody". *Pharm. Res.*, 16, 360-358, 1999
- [80] Maa, Y. F., Nguyen, P. A., Sweeney, T., Shire, S. J., Hsu, C. C., "Protein inhalation powders: Spray drying vs spray freeze drying". *Pharm. Res.*, 16, 249-254, 1999
- [81] Tzannis, S. T., Prestrelski, S. J., "Activity-stability considerations of trypsinogen during spray drying: effects of sucrose". *J. Pharm. Sci.* 88, 351-359, 1999
- [82] Tzannis, S. T., Prestrelski, S. J., "Moisture effects on protein-excipient interactions in spray-dried powders. Natur of destabilizing effects of sucrose". *J. Pharm. Sci.*, 88, 360-370, 1999
- [83] Hageman, M., "Water sorption and solid state stability of proteins. In: *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A. Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*". T. Ahern and M. C. Manning, Eds, Plenum Press, New York, 273-309, 1991
- [84] Carpenter, J. F., Izutsu, K., Randolph, T. W., "Freezing and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stailizing additives". in L. R Rey and J. C. May (eds.), *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*, Marcel Dekker, Inc., New York. 123-160, 1999
- [85] Arakawa, T. S., Prestrelski, W. C., Kenney W. C., Carpenter, J. F., "Factors affecting short and long-term stabilities of proteins". *Adv. Drug. Rev.* 10, 1-28, 1993
- [86] Franks, F., Hatley, R. H. M., Mathias, S. M., "Material science and production of shelf stable biological". *Biopharm*, 4, 38-55, 1991
- [87] Timasheff, S.N., "Solvent effects on protein stability". *Curr. Pin. Struct. Biol.*, 2, 35, 1992

- 
- [88] Timasheff, S. N., Arakawa, T., "Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents". *J. Crystal Growth*, 90, 39, 1988
- [89] Schellman, J. A., "A simple model for solvation in mixed solvents. Applications to the stabilization and destabilization of macromolecular structures". *Biophys. Chem.*, 37, 121, 1990
- [90] Franks, F., "Freeze drying: from empiricism to predictability". *Cryo. Lett.*, 11, 93, 1990
- [91] Pikal, M. J., "Freeze-drying of proteins: II. Formulation selection". *Biopharmaceutics*, 3, 26, 1990
- [92] Malamud, D., Drysdale, J. W., "Isoelectric points of proteins: a table". *Anal. Biochem.*, 86, 620, 1978
- [93] Privalov, P. L., "Cold denaturation of proteins". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 25 (4), 281-303, 1990
- [94] Fink, A. L., "Effects of Cryoprotectants on enzyme Structure". *Cryobiology*, 23, 28-37, 1986
- [95] Douzou, P., "Cryoenzymology in aqueous media"., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 51, 1-74, 1980
- [96] Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler H. H., Buchner, J., "Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation". *Bio/Technology*, 9, 9, 825-829. Ref: 42., 1991
- [97] Floris, Franca Maria; Persico, Maurizio; Tani, Alessandro; Tomasi, Jacopo "Hydration shell structure of the calcium ion from simulations with ab initio effective pair potentials". *Chem. Phys. Lett.*, 227, 1-2, 126-32, 1994
- [98] Conway, B. E., "Ion hydration co-sphere interactions in the double-layer and ionic solutions". *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, 123, 1, 81-94, 1981
- [99] Carpenter, J. F., Chang, B. S., "Lyophilization of protein pharmaceutical". In: *Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*. (K E. Avis and V. L. Wu Eds.), Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, pp. 199-264, 1996
- [100] Chang, B. S., Kendrick, B. S., Carpenter, J. F., „Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants". *J. Pharm. Sci.* 85: 1325-1330, 1996

- [101] Anchordoquy, T. J., Carpenter, J. F., „Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state”. Arch. Biochem. Biophys. 332, 231-238, 1996
- [102] Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S., Randolph, T. W., Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice, Pharm. Res., 14, 8, 969-975, 1997
- [103] Prestrelski, S. J., Pikal, K. A., Arakawa, T., “Optimization of lyophilization conditions for recombinant human interleukin-2 by dried-state conformational analysis using Fourier-transform infrared spectroscopy”. Pharm. Res. 12, 1250-1259, 1995
- [104] Chang, B. S., Beauvais, R. M., Dong, A., Carpenter, J. F., “Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation”. Arch. Biochem. Biophys. 331, 249-258, 1996
- [105] Prestrelski, S. J., Arakawa, T., Carpenter, J. F., „Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy“. Arch. Biochem. Biophys. 303, 465-473, 1993
- [106] Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, D., Carpenter, J. F., „Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation”. J. Pharm. Sci. 84, 415-424, 1995
- [107] Allison, S. D., Dong, A., Carpenter, J. F., “Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration”. Biophys. J., 71, 2022-2032, 1996
- [108] Carpenter, J. F., Crowe, L. M., Crowe, J. H., “Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations”. Biochim. Biophys. Acta 923, 109-115, 1987
- [109] Carpenter, J. F., Hand, S. C., Crowe, L. M., Crowe, J. H., “Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations”. J. H. Arch. Biochem. Biophys. 250, 505-512, 1986
- [110] Saror, G., Mayer, E., Johari, G. P., “Calorimetric studies of the kinetic unfreezing of molecular motions in hydrated lysozyme, haemoglobin and myoglobin”. Biophys. J. 66, 249-258, 1994

- 
- [111] Treuheit, M., Kosky, A. A., Brems, D. N., "Inverse relationship of protein concentration and aggregation". *Pharm. Res.*, 19 (4), 511-516, 2002-06-17
- [112] Webb, S. D., Cleland, J. L., Carpenter, J. F., Randolph, T. W., "A new mechanism for decreasing aggregation of recombinant human interferon- $\gamma$  by surfactant: slowed dissolution of lyophilized formulations in a solution containing 0.03 % polysorbate 20"., *J. Pharm. Sci.*, 91 (2), 543-558, 2002
- [113] Sadhale, Y., Shah, J. C., "Biological activity of insulin in GMO gels and the effect of agitation". *Int. J. Pharm.* 191 (1), 65-74, 1999
- [114] Sadhale, Y., Shah, J. C., "Stabilization of insulin agitation-induced aggregation by the GMO cubic phase gel". *Int. J. Pharm.* 291 (1), 51-64, 1999
- [115] Merck Eurolab GmbH, "Der Laborkatalog Merck®", 2001
- [116] Körber Ch., "Phenomena at the advancing ice-liquid interface: solutes, particles and biological cells". in *Quarterly Review of Biophysics* 21 (2), 229-298, 1988
- [117] Chang, B. S., Randall C. S., "Use of Subambient Thermal Analysis to Optimize Protein Lyophilization". in *Cryobiology* 29, 632-656, 1992
- [118] Höhne, G., Hemminger W., Flammerheim, H. J., „Differential Scanning Calorimetry“. Springer-Verlag Berlin, 111-115, 1996
- [119] Kurz, W., Fisher, D., "Fundamentals of solidification". Aedermannsorf: Trans Tech., 1989
- [120] Donelley Webb, S., Webb, J. N., Hughes, T. G., Sesin, D. F., Kincaid, A. C., "Freezing Biopharmaceuticals Using common Techniques – and the Magnitude of Bulk-Scale Freeze-Contentration". in *BioPharm*, 22-34, 05/2002
- [121] Kohn, W. D., Kay, C. M., Hodges, R. S., "Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs"., *J. Mol. Biol.*, 267, 1039-1052, 1997
- [122] Wang, W., "Instability , stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals". *Int. J. Pharm.*, 185, 129-188, 1999
- [123] Chan, H.-K., Alu-Yeung, K.-L., Gonda, I., "Effects of additives on heat denaturation of rhDNase in solutions". *Pharm. Res.* 13, 756-761, 1996
- [124] Goto, Y., Fink, A. L., "Conformational states of  $\beta$ -lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salts". *Biochemistry*, 28, 945-952, 1989

- [125] Anfinsen, C. B., "Principles that govern the folding of the protein chains".  
Science 181, 223-230, 1973
  
- [126] Cleland, J. L., Lam, X., Kendrick, B. S., Yang, J., Tzung, H., Overcashier, D. E.,  
Brooks, D., Hsu, C., Carpenter, J. F., "A specific molar ratio of stabilizer to  
protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody".  
J. Pharm. Sci. 90 (3), 310-321, 2000



# CURRICULUM VITAE

## PERSÖNLICHE DATEN

Ralf Zippelius  
Geboren am 26. Mai 1973  
in Straubing  
ledig  
deutsch

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

1979 - 1983 Volksschule St. Martin I, Deggendorf  
1983 - 1992 Robert-Koch-Gymnasium, Deggendorf  
1992 Allgemeine Hochschulreife  
(Abschluß: 1.9)

## STUDIUM

11/92 - 5/93 Chemie, LMU München  
5/93 - 11/97 Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität,  
München  
3/99 Approbation als Apotheker

## PRATKIKA

12/97 - 5/98 Rondell Apotheke, München  
7/98 – 12/98 Merck KGaA Darmstadt  
Institut für Pharmakokinetik und  
Metabolismus, Grafing b. München

## WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

08/99 bis 07/2002 Disseration am Lehrstuhl für Pharmazeutische  
Technologie und Biopharmazie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München  
Prof. Dr. G. Winter im Rahmen einer  
Forschungs- Kooperation mit der Fa. Roche  
Diagnostics GmbH, Penzberg